

AUS DER ABTEILUNG FÜR UNFALLCHIRURGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. MED. MICHAEL NERLICH  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EINFLUSS DES DIFFERENZIERUNGSGRADES MESENCHYMALER  
STAMMZELLEN IN TISSUE ENGINEERING MATRICES AUF DAS  
ANGIOTAKTISCHE VERHALTEN IN VIVO

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Universität Regensburg

vorgelegt von  
Vincent M. Reitz

2016





AUS DER ABTEILUNG FÜR UNFALLCHIRURGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. MED. MICHAEL NERLICH  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EINFLUSS DES DIFFERENZIERUNGSGRADES MESENCHYMALER  
STAMMZELLEN IN TISSUE ENGINEERING MATRICES AUF DAS  
ANGIOTAKTISCHE VERHALTEN IN VIVO

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Universität Regensburg

vorgelegt von  
Vincent M. Reitz

2016

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
Referent:	Prof. Dr. Peter Angele
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
Tag der mündlichen Prüfung:	22. Februar 2017

Der Promovend ist Arzt

*meinen Eltern gewidmet*

Was man an der Natur Geheimnisvolles pries,  
Das wagen wir verständig zu probieren.

J. W. von Goethe



# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>4</b>
1.1	Aufbau des Gelenkknorpels .....	5
1.2	Entwicklung des Gelenkknorpels .....	6
1.3	Pathophysiologie des Gelenkknorpels .....	7
1.4	Angiogenese.....	8
1.5	Tissue Engineering.....	10
1.5.1	Zellursprung.....	10
1.5.2	Regulationsfaktoren.....	10
1.5.3	Matrix .....	11
1.5.4	In vitro Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen .....	12
1.5.5	In vivo Verhalten mesenchymaler Stammzellprodukte .....	13
1.6	Intravitalmikroskopie .....	13
1.7	Hypothesen .....	15
<b>2</b>	<b>Material.....</b>	<b>16</b>
2.1	Chemikalien und Reagenzien .....	16
2.2	Puffer und Lösungen.....	18
2.3	Medien .....	20
2.4	Enzyme und Antikörper .....	21
2.5	Kits.....	21
2.6	Zellmaterial und Tiere.....	21
2.7	sonstiges Biomaterial .....	22
2.8	Geräte .....	22
2.9	Verbrauchsmaterial .....	23
2.10	Software .....	24
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>25</b>
3.1	Übersicht Versuchsplanung.....	25
3.2	Zellkultur.....	26
3.2.1	Zellgewinnung und Aufbereitung.....	26
3.2.2	Auftauen und Expandieren der Zellen.....	26
3.2.3	Auswahl des geeigneten Zellmaterials .....	27

3.2.4	Beimpfen der Tissue-Engineering Matrices .....	28
3.2.5	Differenzierung.....	29
3.2.6	Lebendzellzahlbestimmung .....	29
3.3	Tierversuch.....	30
3.3.1	Implantation der Zell-Matrixkonstrukte und Rückenhautkammern.....	30
3.3.2	Intravitalmikroskopie.....	31
3.3.3	Bestimmung der Gefäßdichte und –funktionalität.....	32
3.4	Analyse des gewonnen Materials.....	33
3.4.1	Histologie.....	33
3.4.2	Immunohistochemie .....	35
3.4.3	Immunoassay Verfahren ELISA .....	37
3.5	Statistik .....	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
4.1	Vorversuche.....	40
4.2	Feststellen des Differenzierungsgrades.....	40
4.2.1	ELISA VEGF Zellkulturmedienüberstand .....	42
4.3	Einfluss der Zelldifferenzierung auf die Angiogenese in vivo .....	44
4.3.1	Intravitalmikroskopie.....	44
4.3.2	Immunhistochemie .....	49
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>54</b>
5.1	Diskussion der Ergebnisse .....	54
5.1	Diskussion der Methoden .....	59
5.2	Zusammenfassung.....	61
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>73</b>
<b>9</b>	<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>74</b>
<b>10</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>75</b>





# 1 Einleitung

Einer hohen Anzahl traumatischer und degenerativer Läsionen des Gelenkknorpels steht gegenwärtig ein breites Spektrum an Behandlungsstrategien gegenüber. [1] Allen gemein ist die begrenzte Möglichkeit zu einer Restitutio ad Integrum, der vollständigen Ausheilung. Da das biomechanisch stark beanspruchte Gewebe über eine geringe Regenerationsfähigkeit verfügt, [2] gestatten Therapien eine Funktionswiederherstellung zumeist nur unter der Integration des bestehenden Defekts im Sinne einer Reparatio. Ein Zustand, der das anvisierte Therapieziel des schmerzfreien optimalen Funktionserhalts dauerhaft gefährdet und häufig zu fortschreitenden degenerativen Erscheinungen wie der Arthrose führt. [3, 4]

Moderne Verfahren verfolgen daher das Ziel, defekte Areale durch neu gebildeten Knorpel zu ersetzen und bedienen sich dazu unter anderem der Methode des Tissue Engineerings. [5]

Grundlage bilden hierbei autologe mesenchymale Stammzellen [1], die nach ihrer Entnahme aus dem Spenderorganismus zunächst in vitro kultiviert werden. Nach ausreichender Proliferation durchlaufen die Zellen eine Differenzierungsphase zu Knorpelzellen, um in Stützgerüsten, sogenannten Matrices, einen gewebeähnlichen Verband zu bilden. Trägermatrices bestehen aus porösen Strukturen [6], die gleichsam eine Immobilisierung der Zellen im dreidimensionalen Raum unter Wahrung der Kommunikationsmöglichkeit untereinander ermöglichen als auch eine ausreichende Penetrationsfähigkeit von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren in den Zellverband hinein sowie einen Abtransport metabolischer Endprodukte gewährleisten müssen. [7]

Will man Tissue-Engineering-Konstrukte in den Organismus implantieren, so besteht die primäre Herausforderung darin, initial eine erfolgreiche Integration zu erzielen, die in der vorgeschädigten Umgebung dauerhaft aufrecht erhalten werden kann. [8] Zudem muss die neu geschaffene Einheit den biomechanischen Belastungen des Knorpelgewebes in vivo standhalten können. [9, 10]

Um diesen Prozess im Gesamten zu ermöglichen, müssen Struktur, Reifung und die funktionelle Homöostase des adulten Gelenkknorpels ausreichend verstanden und für die therapeutische Anwendung bei pathologischen Veränderungen erfolgreich imitiert werden. [7]

## 1.1 Aufbau des Gelenkknorpels

Gelenkknorpel ist ein komplexes Gewebe, das die Oberflächen von Gelenken zur Verbesserung ihrer Gleitfähigkeit und der Stoßabsorption mit einer Schichtdicke von bis zu 5 mm überzieht. (Abb. 1-1) [11] Er setzt sich im Wesentlichen aus reifen Knorpelzellen, den Chondrozyten zusammen. Sie produzieren kontinuierlich die sogenannte Extrazellulärmatrix, die den größten Volumenanteil des Gewebes darstellt und die in kleinen Gruppen angeordneten Chondrozyten vollständig umgibt. Die Extrazellulärmatrix besteht zum größten Teil aus Wasser und ist von einem Gerüst aus Kollagenfibrillen durchzogen. Die einzelnen Fibrillen sind durch eine Gruppe unterschiedlicher Proteine zu einem großen Netzwerk zusammengeschlossen, die in ihrer Gesamtheit als Proteoglycane bezeichnet werden. [12]

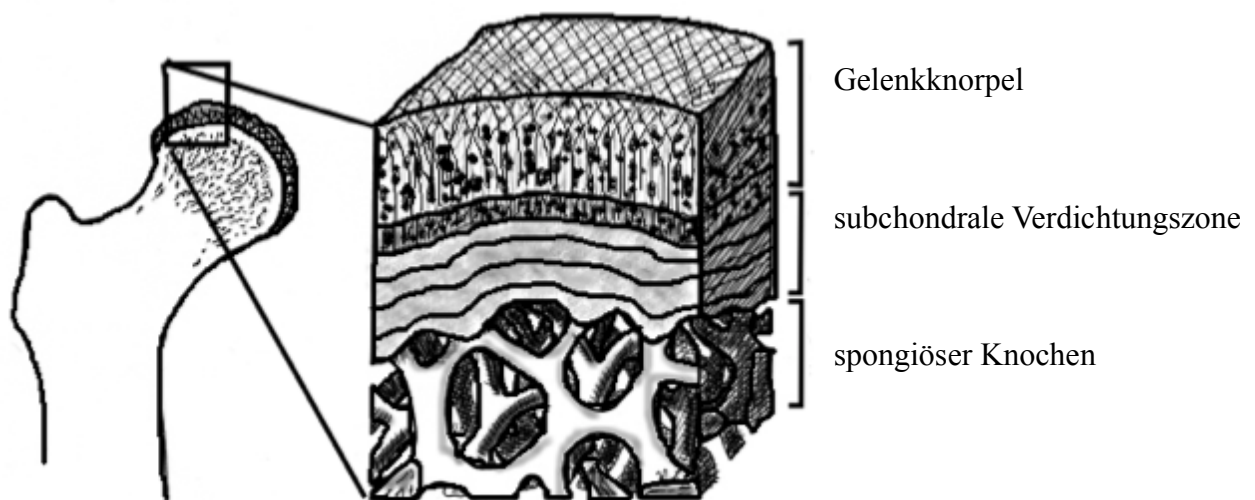


Abbildung 1-1 Aufbau Gelenkknorpel

Für die starke Belastungsfähigkeit des Gewebes sind die im Kollagengerüst immobilisierten negativen Ladungsträger verantwortlich. Proteoglycane verfügen über zahlreiche Thiol-Gruppen, die durch intra- und intermolekulare Wechselwirkungen einerseits große Mengen Wasser binden und darüber hinaus durch Abstoßungsreaktionen untereinander eine maximale räumliche Ausdehnung des Stützgerüsts bewirken. [13]

Durch das jeweilige Gleichgewicht aus Zugkräften und Expansionsdruck erklären sich die Kompressionsfähigkeit und die Elastizität des Gewebes unter Bewegung und der damit einhergehenden Belastung: Wird Druck auf das Gewebe ausgeübt, ist in begrenztem Ausmaß eine Annäherung negativer Ladungsträger möglich. Wasser wird in diesem Schritt verdrängt. Bei Nachlassen des Drucks dehnen sich die Proteoglycane in dem durch das Kollagenfibril-

lennetzwerk vorgegebenen Maß räumlich aus. Wasser wird konsekutiv nachgezogen und das Gewebe nimmt seine ursprüngliche Form an. [13] Notwendig ist die Diffusionsbewegung des Wassers überdies für den Transport von Nährstoffen, da der Gelenkknorpel keine Gefäßversorgung aufweist. [14]

Eine Abweichung in der Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix ist somit unmittelbar mit einer Einschränkung der Funktionsfähigkeit des Gewebes assoziiert.

Chondrozyten des gesunden Gelenkknorpels behalten ihren Differenzierungsgrad dauerhaft bei. [15] Da sich deren metabolische Aktivität weitestgehend auf die Produktion und die Organisation der Extrazellulärmatrix konzentriert, bleibt auch diese in ihrer Zusammensetzung konstant. [16] Dahingegen sind einzelne Entwicklungsstadien im Verlauf der Chondrogenese durch jeweils unterschiedliche Zusammensetzungen der Extrazellulärmatrix gekennzeichnet. [17, 18]

## **1.2 Entwicklung des Gelenkknorpels**

Pluripotente mesenchymale Stammzellen (MSCs) bilden den Ursprung zahlreicher Gewebe. In der Embryonalentwicklung entstehen aus ihnen auf verschiedenen Differenzierungswegen Sehnen, Bänder, Muskeln, Knochenmarkszellen, Bindegewebe, Adipocyten sowie Knochen und Knorpel. Im adulten Organismus dienen sie darüber hinaus als Vorläuferzellen der Regeneration und Aufrechterhaltung von Geweben. [19] Hervorgegangen aus Mesenchymzellen bilden Chondroblasten die unmittelbare Vorstufe der Chondrozyten. [20-22] Während sie in der Phase des frühen interstitiellen Wachstums noch proliferieren, stellen sie diese Aktivität im Folgenden ein und verbleiben in der sich aus den letzten Zellteilungen ergebenden Anordnung in sogenannten isogenen Gruppen. Einzig in der bindegewebigen Kapsel, dem Perichondrium, die den Gelenkknorpel umgibt, finden sich noch Vorläuferzellen der Chondroblasten, die zu appositionellem Wachstum befähigt sind. [13, 23]

Typisch für die Extrazellulärmatrix der mesenchymalen Vorläuferzellen ist das Kollagen I [24]. Dessen Produktion wird in den folgenden Entwicklungsschritten reduziert und durch Kollagen II sowie durch Proteoglycane ersetzt, die zusammen den Hauptbestandteil der Matrix des reifen Chondrozyten bilden. [12, 17]

Schließt sich an diese als Chondrogenese bezeichnete Entwicklung eine weitere Zelldifferenzierung an, so entsteht über die sogenannte enchondrale Ossifikation Knochen - ein Prozess der unter physiologischen Bedingungen Beispielsweise in den Epiphysenfugen stattfindet und dort zu Knochenwachstum führt. [25] Dabei hypertrophieren Chondrozyten, das bedeutet ihr

Zellvolumen nimmt zu. Morphologisch sichtbar ist in diesem Stadium die Bildung größerer Lakunen um den Zellkern herum. Sie produzieren fortan vermehrt Kollagen X, während das Vorkommen von Kollagen II in der Matrix reduziert wird. Ferner ist eine vermehrte Produktion der alkalischen Phosphatase (AP) und des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) festzustellen. [17] Subchondral gelegene Gefäße penetrieren auf dieses Signal hin das in der Transformation begriffene Knorpelgewebe [12], immigrierende Osteoklasten degradieren die bestehende Matrix [26] und Chondrozyten transformieren entweder zu Osteoblasten und bewirken eine Mineralisierung der Matrix oder gehen in die Apoptose über. [27, 28] [29]

### **1.3 Pathophysiologie des Gelenkknorpels**

Um seine Funktion unter permanenter Belastung gewährleisten zu können, muss der Gelenkknorpel seine Struktur kontinuierlich aufrechterhalten. Im Gegensatz zu vielen anderen Gewebearten des menschlichen Organismus weist er dabei eine beachtliche Konstanz auf: Reife Chondrozyten zeigen lebenslang keine weitere Mitoseaktivität und auch die von ihnen produzierten Extrazellulärmatrixkomponenten wie zum Beispiel das Aggrecan verfügen über eine Lebensdauer von 3 bis 24 Jahren, das Kollagenetzwerk sogar über mehr als 100 Jahre [30]. Aufgrund seiner sehr geringen Erneuerungsrate wird der Gelenkknorpel auch als bradytrophes Gewebe bezeichnet. Seine Regenerationsmechanismen benötigen dementsprechend viel Zeit, um eine aufgetretene Läsion zu begrenzen. Dass diese Mechanismen meist nicht ausreichend effektiv sind, um eine Strukturveränderung zu kompensieren und Folgeschäden zu verhindern, wird in Anbetracht der zahlreichen Gelenkerkrankungen deutlich.

Die Arthrose, bei der ein fortschreitender degenerativer Schaden des Gelenkknorpels vorliegt [31, 32], wird weltweit als häufigste Gelenkerkrankung [33] verzeichnet. Ihre Pathophysiologie basiert auf dem nachhaltig gestörten Gleichgewicht anaboler und kataboler Vorgänge. [34-36] Obwohl viele der daran beteiligten Faktoren und Enzyme inzwischen identifiziert werden konnten, ist über deren genaue Interaktion und Regulation gegenwärtig wenig bekannt. Als gesichertes Erkenntnis auf Seite der destruktiven Mechanismen gilt die gesteigerte Aktivität proteolytischer Enzyme (Matrix Metalloproteinasen und Aggrecanasen) sowie eine durch entsprechende Cytokine (Leukine und Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) vermittelte inflammatorische Komponente. [25, 36, 37]

Auf zellulärer Ebene stellt die hypertrophe Differenzierung von Chondrozyten eine typische pathologische Veränderung der Arthrose dar. [38] Während die Hypertrophie in der Epiphyse zu einem physiologischen Knochenwachstum führt, resultiert die fortschreitende Mi-

neralisierung und Bildung knöcherner Anteile in einer irreversiblen Destruktion des Gelenkknorpels mit nachfolgenden Umbauten des subchondral gelegenen Knochens. [25] Auch Gelenkergüsse durch die synoviale Reizung kristalliner Absonderungen sind häufig. [39] Symptomatisch werden diese Veränderungen für den Patienten durch Schmerzen und Bewegungseinschränkungen, die letztlich zu einem vollständigen Funktionsverlust des Gelenks führen können und eine endoprothetische Versorgung notwendig machen.

#### **1.4 Angiogenese**

Angiogenese bezeichnet den Vorgang der Aussprossung neuer Gefäße aus einem bestehenden Gefäß heraus. Zunächst handelt es sich dabei um einen physiologisch bedeutsamen Vorgang. Er ist in der Embryo- und Organogenese zu beobachten, findet aber auch später im ausgewachsenen Organismus unter anderem bei der Wundheilung statt. Krankheitswert erlangt die Angiogenese erst, wenn das Gefäßwachstum an Stellen auftritt, die unter normalen Bedingungen avaskulär verbleiben, oder wenn es in einem höheren als dem benötigten Maß zu einer Neubildung kommt. Klassischerweise ist dies bei Gefäßmalformationen oder bei einem Carcinom zu beobachten, das so Versorgungsstrukturen zur Aufrechterhaltung seines stark erhöhten Metabolismus schafft. Auch am Gelenkknorpel, der in seiner gesunden Grundstruktur keine Vaskularisierung aufweist [40], können Erkrankungen durch ein neu auftretendes Gefäßwachstum imponieren. Charakteristisch ist dies unter anderem für die Arthrose. [41]

Reguliert wird die Angiogenese durch ein Verhältnis aus pro- und anti-angiogenen Faktoren. Nachgewiesen werden konnte die Wirkung von Chondromodulin-I und Cartilage Derived Inhibitor als Garanten der Avaskularität [42, 43] sowie die primäre Bedeutung von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) [44] für die Induktion einer Gefäßneubildung. Sie tragen dazu bei, dass aus vorbestehenden subchondral gelegenen Gefäßen eine Migration, Invasion und Adhäsion von Endothelzellen [45] stattfindet. Diese formieren sich zu tubulären Zisternen, die sich durch die Herausbildung einer gemeinsamen Membran zusammenschließen und das erste fragile Vorläuferkonstrukt eines Gefäßes bilden. Weitere, ebenfalls durch VEGF beeinflusste Spezifizierungen führen letztlich zu einem reifen, stabilen Mikrogefäß. [46]

Es ist bekannt, dass Angiogenese und inflammatorische Prozesse, die eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer Arthrose einnehmen, häufig miteinander einhergehen. [47] Insbesondere der Übergang zu einer chronischen Inflammation, so vermuten Liekens et. al., sei wesentlich durch die Angiogenese beeinflusst [48]. Zellen, die unmittelbar am inflammatori-

schen Geschehen beteiligt sind, sind unter anderem Makrophagen. Von ihnen ist bekannt, dass sie eine Vielzahl pro-angiogener Faktoren produzieren, so auch VEGF. [49] Die auf diesem Weg angeregte Neubildung einer Gefäßversorgung ermöglicht den optimalen Transport von Nährstoffen und gestattet gleichzeitig durch die initial poröse Membranstruktur der neuen Gefäße eine verstärkte Invasion immunmodulierender Cytokine und weiterer beteiligter Zellen des Immunsystems. [50] Einerseits werden so die Aufrechterhaltung und die Ausweitung des metabolisch hochaktiven Vorgangs einer Inflammation unterstützt, der wiederum durch weitere VEGF-Produktion die Angiogenese verstärkt anzuregen vermag.

Eine ähnliche Wechselwirkung, bei der eine klare Zuweisung von Auslöser und Folgeaktion noch nicht eindeutig getroffen werden konnte, besteht auch zwischen der Angiogenese und der Hypertrophie von Chondrozyten. Im Hinblick auf die enchondrale Ossifizierung scheint der Zusammenhang klar: Der hypertrophe Chondrozyt in der Wachstumsfuge produziert VEGF, sodass sich die Vaskularisierung und Mineralisierung der Matrix sowie die Bildung reifen Knochens anschließen. Findet eine pathologische hypertrophe Differenzierung des Chondrozyten im Gelenkknorpel statt, so wird das von ihm produzierte VEGF über Diffusionsvorgänge und die Synovia [51] transportiert. Die Dysbalance wird so zugunsten pro-angiogener Faktoren verstärkt [52], die die Einsprossung neuer Gefäße konsekutiv fördern [53]. Immigrierende Endothelzellen selbst produzieren jedoch auch Faktoren, die die Differenzierung von Chondrozyten beeinflussen und damit ebenfalls eine Hypertrophie induzieren können. [54] So haben Pesesse et.al. postuliert, dass Hypertrophie und Angiogenese zwei sich gegenseitig bedingende komplexe pathophysiologische Prozesse des arthrotischen Gelenkknorpels seien. [38] Während letztere den Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad und angiogener Potenz in vitro untersucht haben, ist es Ziel der vorliegenden Arbeit, einen in vivo Ansatz zur weitergehenden Analyse zu wählen.

Ebenfalls im Kontext zur Angiogenese stehend ist das Einwachsen von Nerven in den Gelenkknorpel, das mit einem entscheidenden Einfluss auf die Schmerzsymptomatik im Rahmen der Arthrose einhergeht. [38, 55, 56] In der histologischen Analyse von arthrotisch verändertem Gelenkknorpel wurden sympathische und sensorische Nervenfasern unabhängig vom Schweregrad der Arthrose häufig und ausschließlich perivaskulär identifiziert. [55]

Die Angiogenese stellt zusammengefasst einen zentralen pathophysiologischen Aspekt vieler Gelenkerkrankungen, insbesondere der Arthrose dar. Aufgrund dessen könnte sie sich als zentraler Angriffspunkt wirkungsvoller Therapiestrategien eignen. Für die Entwicklung entsprechender Substanzen bedarf es jedoch genauerer Kenntnisse hinsichtlich ihrer Regulation und ihrer Auswirkungen auf andere Prozesse.

## **1.5 Tissue Engineering**

Der Begriff des Tissue Engineerings verbindet den mechanischen Vorgang der Konstruktion mit dem Gegenstand belebter Materie und spiegelt so die Verknüpfung aus Material- und Biowissenschaften wieder. Ziel dieser Disziplin ist es, ausgehend von einzelnen Zellen durch den Einsatz geeigneter Kulturbedingungen unter Zuhilfenahme von Stützgerüsten ein passendes Gewebesubstitut zu generieren, das im lebenden Organismus die Funktion eines irreversibel erkrankten Gewebes ersetzen kann. [5, 57]

### **1.5.1 Zellursprung**

Grundlage für die Auswahl geeigneten Zellmaterials zur Defektdeckung sollte zum einen die Erwägung sein, dass dieses durch eine Methode gewonnen werden kann, die für Patienten im Sinne des „primum nil nocere“ ein vertretbares Risiko in Bezug auf den zu erwartenden Nutzen darstellt. Zum anderen ist die Vitalität der Zellen mit einer entsprechenden Fähigkeit zur Differenzierung und zur Integration in die spätere Umgebung entscheidend. Besonders im Hinblick auf letztere ist der autologen Zellspende der Vorzug einzuräumen, die das Risiko für immunologische Abstoßungsreaktionen minimiert. [58, 59]

Für die Versuche wurden daher multipotente mesenchymale Stammzellen mit dem Ursprung aus dem Beckenkamm gewählt, dessen Punktion einen Eingriff geringer Invasivität darstellt. Mesenchymale Stammzellen haben sich in zahlreichen Studien als zuverlässig isolierbar und kultivierbar [22] sowie zur chondralen Defektdeckung geeignet erwiesen. [60-62]

### **1.5.2 Regulationsfaktoren**

Um den Prozess der Chondrogenese ausgehend von der mesenchymalen Stammzelle in vitro nachvollziehen zu können, bedarf es einer genauen Kenntnis der zugrunde liegenden Regulationsmechanismen. Daher ist es Gegenstand zahlreicher Studien aus dem Bereich des Tissue-Engineerings, die Wachstumsfaktoren zu identifizieren, die die Einleitung einer weitergehenden Differenzierung beeinflussen oder zur Aufrechterhaltung einer Differenzierungsstufe beitragen.

Als Grundvoraussetzung für die in vitro Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen wird übereinstimmend eine hohe Zelldichte genannt [63], die die erfolgreiche Kommunikation über Zell-Zell und Zell-Matrix-Kontakte ermöglicht. [64] In diesem Zusammenhang haben sich sowohl Pellet-Kulturen [7] als auch die Kultivierung in dreidimensionalen Trägermatrizes [6]

als erfolgreich erwiesen. Zu den chondroinduktiven Wachstumsfaktoren werden übereinstimmend der Insulin-like-growth-factor (IGF) [65], der Transforming-growth-factor- $\beta$  (TGF  $\beta$ ) sowie die Bone morphogenic proteins (BMP) gezählt. Außerdem sind eine serumfreie Umgebung und die Zugabe von Dexamethason notwendig. [66] Insbesondere TGF- $\beta$  und Dexamethason sind in der Lage, die Chondrogenese nicht nur zu induzieren, sondern auch eine darüber hinausgehende Differenzierung dauerhaft zu inhibieren. [67, 68]

Für eine Überführung in die Hypertrophie ist es demzufolge notwendig, den TGF- $\beta$  vollständig zu entziehen und Dexamethason zumindest deutlich zu reduzieren. [63] Als aktiv hypertrophieinduzierender Faktor gilt L-Thyroxin, [69] das auch in der enchondralen Ossifikation der Wachstumsfuge eine entscheidende Rolle spielt.

### 1.5.3 Matrix

Nicht erst zur Implantation der Zellen in den lebenden Organismus ist die Konfiguration in einem vitalen Zellverband notwendig, auch bereits während der Differenzierungsphase ist die räumliche Anordnung der Zellen zueinander von hoher Bedeutung. [63] [64] Als besonders geeignet haben sich daher Stützgerüste, sogenannte Matrices erwiesen, die je nach Einsatzspektrum eine hohe Variabilität aufweisen.

Idealerweise sollten sie mit der Umgebung, in die sie eingesetzt werden, vollständig kompatibel sein, also keine Abstoßungsreaktionen oder Gewebereizungen hervorrufen. Dennoch sollten sie als Fremdkörper nur so lange wie zur erfolgreichen Integration in das Defektareal nötig im Organismus verbleiben und somit von diesem selbst abbaubar sein. [62] Zur Besiedelung muss das Material den Zellen gestatten, an der Oberfläche adhärent zu werden. [70] Zusätzlich ist ein hohes Maß an Porosität erforderlich, sodass eine gleichmäßige Durchdringung möglich wird. Dadurch wird ebenfalls sichergestellt, dass die Penetration von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren möglich ist, ein Gasaustausch stattfinden kann und der Abtransport von Stoffwechselendprodukten gelingt. [71, 72] Überdies zählt es zu den Materialeigenschaften moderner Matrices, dass diese bereits chondrokonduktiv wirken, das heißt, den Differenzierungsvorgang selbst fördern. Zu den auf diese Art wirksamen Substanzen zählen unter anderem die Hyaluronsäure und Gelatine-Komposit. [73, 74]

Wünschenswert wäre ein Modell, das all diese Eigenschaften in optimaler Ausprägung in sich vereint. In der praktischen Umsetzung gelingt dies bislang nur näherungsweise. [75] So ist vor allem der Zeitpunkt der Degradierung durch Wechselwirkungen zwischen Zellen, Matrix, Nährmedien und dem späteren Organismus schwer justierbar.



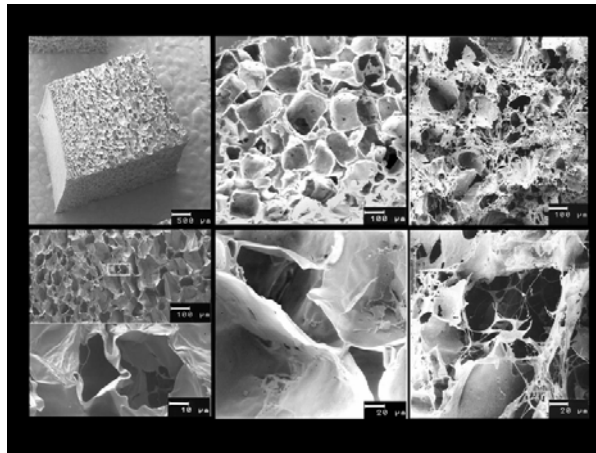


Abbildung 1-2 Matrix rasterelektronenmikroskopisch (mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. R. Kujat, experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Regensburg)

Eine Eigenentwicklung der Abteilung für Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Regensburg hat sich in vorangegangenen Experimenten hinsichtlich ihres Eigenschaftsprofils als Matrix bewährt. Die Matrices haben sich in der Zellkultur als effektiv und gut verträglich, sowie in der weiteren Verwendung als mechanisch belastbar erwiesen. [74] Im Ergebnis zeigte sich überdies eine gute Biokompatibilität des biodegradierbaren Materials bestehend aus einem Komposit aus Hyaluronsäurebenzylester und Gelatine. Damit weist sie eine hohe Strukturverwandschaft zu der Extrazellulärmatrix von Knorpelzellen auf [76], sodass die Zellen in eine annähernd physiologische Umgebung eingebracht werden. In der Abbildung 1-2 ist die Matrix in rasterelektronenmikroskopischer Darstellung vor der Beimpfung mit Zellen dargestellt.

#### **1.5.4 In vitro Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen**

Sind die vorgenannten Bedingungen hinreichend erfüllt, so ist eine erfolgreiche chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in vitro regelhaft reproduzierbar. Die Abläufe innerhalb der Differenzierungsphase weisen jedoch Charakteristika auf, die sich von der in vivo Genese signifikant unterscheiden. Pelttari et al. haben die Dynamik der in vitro Chondrogenese einer Zellpelletkultur in einem 3-Phasen-Modell zusammengefasst und als entscheidenden Unterschied das stets frühe Auftreten eindeutiger Hypertrophiemarker beschrieben. So war bereits ab dem 1.-2. Tag nach Beginn der Exposition mit chondroinduktiven Wachstumsfaktoren verstärkt Coll X nachweisbar. [77]

### **1.5.5 In vivo Verhalten mesenchymaler Stammzellprodukte**

Nicht nur die Abfolge der Schritte einer Chondrogenese in vitro, auch die weitere Entwicklung nach Implantation in den lebenden Organismus wies Unterschiede zur natürlichen Knorpelentwicklung auf. So konnten die Zellen das nach Ablauf dieser Kaskade erreichte Differenzierungsstadium nicht stabil beibehalten. Mit einer fortschreitenden Calcifikation und der Gefäßeinwanderung zeigten sich eindeutige Merkmale einer enchondralen Ossifikation. [78] Für den späteren Einsatz als Regenerationsgewebe ist diese Beobachtung in unterschiedlicher Hinsicht von Bedeutung: Einerseits stellt sie ein Hindernis für den dauerhaften Erfolg einer Defektdeckung des Gelenkknorpels dar. Dieser ist zum Funktionserhalt auf eine konstante Matrixbeschaffenheit angewiesen, sodass Hypertrophie gezielt supprimiert werden muss. Gleichsam kann das charakteristische in vitro Verhalten auch als vielversprechender Ansatz für die Verwendung im Rahmen der Behandlung von Knochendefekten herangezogen werden. Die induzierte Calcifikation und Gefäßinvasion nach Implantation in den Organismus imitieren den Vorgang einer Frakturheilung durch enchondrale Ossifikation und wären somit bereits Teil einer notwendigen Entwicklung für die Entstehung eines dauerhaften Regenerationsgewebes im Knochen. [79]

### **1.6 Intravitalmikroskopie**

Die Intravitalmikroskopie stellt ein Verfahren dar, das es gestattet, dynamische Vorgänge in vivo über einen längeren Zeitraum mikroskopisch beobachten zu können. Ursprünglich wurde dieses in der Tumorforschung etabliert [80], um den Effekt von Inhibitoren [81] auf die Vaskularisierung und die Mikrozirkulation von Tumoren beurteilen zu können. [44] Zur lichtmikroskopischen Darstellung eines Tumoreals musste sowohl eine direkte Draufsicht als auch eine minimale Schichtdicke des zu durchdringenden Gewebes ermöglicht werden. Zu diesem Zweck wurden bereits früh Sichtkammern an verschiedenen Körperstellen der Versuchstiere angebracht [82]. Erstmals erwähnt wurde die Rückenhautkammer (dorsal skinfold chamber „DSFC“) 1943. [83] Einige Jahre und wenige Modifikationen später, hielt sie schließlich auch Einzug in die Knochen- und Knorpelgewebeforschung. [84, 85] Die erstmalige Anwendung im Zusammenhang mit Tissue Engineering Produkten aus mesenchymalen Stammzellen, die in die Kammer eingebracht und auf ihr angiotaktisches Verhalten hin beobachtet wurden, ist in der Publikation von Schumann et.al. im Jahr 2002 beschrieben. [86]

Gegenwärtig kommen Kammern aus Titan zum Einsatz, die zum einen den Vorteil aufweisen, dass sie die Versuchstiere mit einem minimalen Gewicht belasten und so die freie Bewe-

gungsfähigkeit erhalten. Auch sind die Materialeigenschaften im Hinblick auf den direkten Kontakt mit der Haut und der Wundfläche günstig: Bei Titan handelt es sich um ein inertes Metall, das zudem durch eine schlechte Temperaturleitfähigkeit kaum zu einer Abkühlung des Umgebungsgewebes und damit zu einer Vasokonstriktion führt. [87] Unter der fortschreitenden Entwicklung von Kamerasystemen konnten Aufnahmen für die spätere Vermessung [88] von Parametern wie der Gefäßdicke generiert werden und auch die gezielte Markierung von Erythrozyten für den Einsatz der Fluoreszenzmikroskopie konnte im dynamischen Blutfluss dokumentiert werden.

Nach einer einmaligen Narkose für den operativen Eingriff der Kammerbefestigung, ist die problemlose Durchführbarkeit der täglichen Beobachtung ein weiterer Vorteil, da diese keine weitere Sedierung der Tiere erfordert, sodass auch hier störende Artefakte durch Nebenwirkungen auf das Kreislaufsystem und den Gefäßtonus vermieden werden. [89]

## 1.7 Hypothesen

Die vorliegende Arbeit vollzieht initial die Imitation einer Zellreifung ausgehend von der mesenchymalen Stammzelle zum Chondrozyten unterschiedlicher Differenzierung in Tissue Engineering Matrices nach, wie sie in vorangegangenen Studien bereits erfolgreich durchgeführt wurde. [63, 65-67, 90, 91] Ein entscheidender Aspekt des Differenzierungsvorgangs ist die Neubildung von Gefäßen, die Angiogenese. Als typisches Merkmal des hypertrophen Knorpels stellt sie einen zentralen Entwicklungsschritt dar, dessen Regulation für unterschiedliche therapeutische Ansätze zur Regeneration von Knorpel- und Knochengewebe von Interesse ist.

Der Hauptteil dieser Arbeit befasst sich daher mit dem Einfluss des Differenzierungsgrades von Knorpelzellen auf den Vorgang der Angiogenese. Vorhandene Studien, die sich gezielt mit dem Zusammenhang von Hypertrophie und Angiogenese befasst haben, basieren fast ausschließlich auf in vitro Experimenten [38] oder wurden lediglich mit isolierten Wachstumsfaktoren, die in den lebenden Organismus eingebracht wurden [92], durchgeführt. Mit der vorliegenden Arbeit sollen aktuelle Erkenntnisse durch einen Transfer der Fragestellung auf einen in vivo Ansatz erweitert werden. Dieser soll mit Hilfe der Intravitalmikroskopie unter dem Einsatz von Rückenhautkammern an Nacktmäusen realisiert werden.

Hypothese 1) Der Differenzierungsgrad mesenchymaler Stammzellen hat einen Einfluss auf deren angiotaktisches Verhalten. Hypertrophe Zellen fördern die Angiogenese.

Hypothese 2) Die gewählte Methode der Intravitalmikroskopie an der Rückenhautkammer ist geeignet, die Angiogenese an Tissue-Engineering-Matrices zu untersuchen.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

Ammonium dihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Calfserum heat inactivated (FCS)	Gibco, Karlsruhe
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Chromalaun Type 90-110 Bloom	Sigma Aldrich, Steinheim
Cobaltchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
D+ Saccharose	Roth, Karlsruhe
DEPC	Sigma Aldrich, Steinheim
DePex	Serva, Heidelberg
Dexamethason	Sigma Aldrich, Steinheim
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma Aldrich, Steinheim
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Dimethylaminobenzaldehyd	Sigma Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
DMMB	Sigma Aldrich, Steinheim
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) high glucose	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) low glucose	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's PBS	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethydiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylenglycolmonoethylether	Sigma Aldrich, Steinheim
Fetal Bovine Serum	PAN Biotech, Aidenbach
Gelatine Porcine skin	Sigma Aldrich, Steinheim
Glutaraldehyd	Roth, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
Hepes	Sigma Aldrich, Steinheim
Hepes buffer	Gibco, Karlsruhe
HFIP	Sigma Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt

ITS+3	Sigma Aldrich, Steinheim
Ketamin 10 %	WDT, Garbsen
L-4 Hydroxyprolin	Fluka, Buchs (CH)
L-Ascorbic Acid	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe
Liquemin N 25000 Heparin	Roche, Grenzach-Wyhlen
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Nickelchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Novocain 1 %	Hoechst, Frankfurt
Papain	Sigma Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd	Riedel-de Haën, Seelze
Pepsin	Sigma Aldrich, Steinheim
Percoll	Biochrom, Berlin
Phosphate buffered saline	Fluka, Buchs (CH)
RPMI 1640 Medium	Gibco, Karlsruhe
Siriusrot F3BA	Chroma, Konegen
Streptomycinpenicillin	PAN Biotech, Aidenbach
TEMED	Roth, Karlsruhe
TGF- $\beta$ 1	R&D Systems, Wiesbaden
Thimerosal	Roth, Karlsruhe
Tissue-Tek	Sakura, Zoeterwoude (NL)
Toluidin Blau O	Sigma Aldrich, Steinheim
TRIS	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Sigma Aldrich, Steinheim
TWEEN 20	Sigma Aldrich, Steinheim
Tyrodessalz	Sigma Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Xylazin 2 %	CP Pharma, Burgdorf

Xylol  
Ziegenserum

Merck, Darmstadt  
Gibco, Karlsruhe

## 2.2 Puffer und Lösungen

ABC-Komplex (Vector Elite Standard Kit)

TRIS-Puffer 0,1 M pH 7,0    2,5 ml  
+ 1 Tropfen Lösung A    ~ 40 µl  
+ 1 Tropfen Lösung B    ~ 40 µl  
30min bei RT inkubieren

Blockingpuffer

TRIS 0,2 M (0,08 M)    120 ml  
NaCl (0,8 %)            2400 mg  
Triton X-100 (0,8 %)    60 ml  
A.d.                        60 ml  
Zu 8 ml Puffer je 1 ml FCS und 1 ml Ziegenserum hinzufügen.

DAB-Stammlösung

Lösung A: 50 mg BSA in 25 ml A.d. lösen (= 0,2 %)  
Lösung B: 250 mg DAB in 25 ml A.d. lösen (= 1 %)  
Lösungen A und B zu gleichen Teilen mischen (= DAB 0,5 %, BSA 0,1 %).

DAB-Arbeitslösung

m-PBS (0,1 M)            4500 µl  
DAB/BSA                  500 µl  
Ni/Co Stammlösung       120 µl  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %                3 µl

Gelatinelösung zur Beschichtung der Objektträger

H <sub>2</sub> O	50 ml
Gelatine Type A Porcine Skin 300 m Bloom Nr.G1890	0,75 g
Chromalaun Type 90-110 Bloom Sigma	0,05 g
Glutaraldehyd G6144 Sigma	125 µl

Gelatine im kalten Wasser quellen lassen, bis zum vollständigen Auflösen leicht erwärmen und nach Erkalten der Lösung Chromalaun und Glutaraldehyd zugeben.

#### m-PBS-Puffer (10x, 1 M)

Gebrauchslösung 1 + 9 mit A.d. verdünnen

$K_2HPO_4 \times 3 H_2O$  47,2g MW

$NaH_2PO_4 \times H_2O$  6,6 g MW

NaCl 36,0 g MW

In ca. 300 ml A.d. lösen, dann auf 500 g mit A.d. auffüllen, pH muss dann zwischen 7,0 und 7,4 liegen.

#### McIlvaine-Puffer

Lösung A: 0,1 M Citronensäure 21 g ad 1l A.d. MW

Lösung B: 0,2 M  $NaH_2PO_4$  35,6 ad 1l A.d. MW

67,8 ml Lösung A + 32,2 ml Lösung B, pH 3,6 kontrollieren.

#### Ni/Co-Stammlösung

Lösung A:  $NiCl_2$  500 mg

$CoCl_2$  25 mg

$H_2O$  25 ml

Lösung B: BSA 50 mg

$H_2O$  25 ml

Lösungen A und B zusammengeben.

#### Pepsin-Andaulösung

1 mg Pepsin in 1 ml McIlvaine-Puffer pH 3,6 gelöst (= 0,1 %)

#### Standardfixans

Paraformaldehyd (f.c. 4 %) 10 g

Phosphatpuffer 0,2 M 125 ml

ad 250 ml A.d.

Paraformaldehyd unter Erwärmen lösen, bis Lösung klar, dann ad 250 ml mit  $H_2O$  auffüllen.



#### TRIS-Puffer 0,2 M

TRIS base 24,228 g

A.d. 900 ml

mit HCL auf pH 7,0 titrieren, ad 1000 ml mit A.d.

#### Tyrodes Lösung

Tyrodes Salz 9,73 g

NaHCO<sub>3</sub> 0,2 g

Streptomycin-Penicillin 10 ml

H<sub>2</sub>O 990 ml

#### Waschpuffer (Immunohistochemie)

TRIS 0,2 M 780 ml

A.d. 2220 ml

NaCl 24,96 g

### 2.3 Medien

Ascorbinsäure: 0,0794 g Ascorbinsäure in 20 ml Tyrodes Lösung

Dexamethason Stocklösung: 0,00392 g Dexamethason in 10 ml 100 % Ethanol

Dexamethason Gebrauchslösung: 200 µl Stocklösung in 19,8 ml DMEM low glucose

Prolin: Stocklösung 40 mg/ml in PBS, steril filtriert

Triiodthyronin: 1 mg T3 in 1 ml 1 M NaOH + 13,86 ml PBS

#### MSC-Medium zum Ansetzen der Aggregate

DMEM Low Glucose (1 g/l)

FCS + 10 %

Pen/Strep + 1 %

HEPES + 1 %

#### Differenzierungsmedium chondrogen

DMEM High Glucose (4,5 g/l)

L-Prolin + 40 µg/ml

Ascorbinsäure + 50 µg/ml

Dexamethason + 100 nM

ITS 3 + 1 %

Pyruvat + 1 mM

TGF + 10 ng/ml

Triiodthyronin -

#### Differenzierungsmedium hypertroph

DMEM High Glucose (4,5 g/l)

+ 40 µg/ml

+ 50 µg/ml

-

+ 1 %

-

-

+ 1 nM

### 2.4 Enzyme und Antikörper

Anti CD31 Clone MEC 13.3 550274

Goat-anti-mouse-biotin IgG 115-065-003

Ziege anti mouse IgG 115-007-003

Coll I Clone: Coll-1 Nr.C2456

Coll II Clone: Coll-II-4C11 Nr. CP18

Coll X Clone: X53 Nr. 031501005

Collagenase

Hyaluronidase

Pepsin hog stomach

Trypsin-EDTA

BD Pharmingen, Heidelberg

Dianova, Hamburg

Jackson ImmunoResearch,  
Westgrove (USA)

Sigma Aldrich, Steinheim

Calbiochem, Darmstadt

Quartett, Berlin

Roche Diagn., Mannheim

Sigma Aldrich, Steinheim

Sigma Aldrich, Steinheim

Gibco, Karlsruhe

### 2.5 Kits

ABC-Kit

DuoSet ELISA Development Kit für human VEGF

PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit

Vectorlabs, Grünberg

R&D Systems, Wiesbaden

Sigma Aldrich, Steinheim

### 2.6 Zellmaterial und Tiere

BALB/c nu/nu Mäuse, 10 Wochen alt, männlich

Charles River, Sulzfeld

Zellreihe LN-714 aus einer Beckenkammpunktion des Menschen, männlicher Spender, 19 Jahre alt

## 2.7 sonstiges Biomaterial

Hyaluronsäurebenzylester-Gelatine-Kompositmatrices (Typ ECM 136) mit 5 mm Durchmesser, 4 mm Höhe und einer Porengröße von 350-450 µm wurden nach einem laboreigenen, patentierten Verfahren (EU Patent Nr. PCT/EP99/09444) hergestellt. Sämtliche im Versuch verwendeten Matrices stammen aus der gleichen Charge und wurden vor dem jeweiligen Versuchsdurchlauf sterilisiert.

## 2.8 Geräte

Bio-Dot Apparatus	BioRad, München
Brutschrank CO2 Heracell 240	Heraeus, Hanau
Calimatic pH-Meter 766	Knick, Berlin
Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
EMax Microplate Reader	MWG Biotech, Ebersberg
Fluoreszenzlampe EBQ 100 dc-z	Leistungselektronik Jena
Fluoreszenzmikroskop HBO100	Leitz, Wetzlar
Fluoreszenz ELISA Reader Fusion	Canberra P., Schwandorf
KL 1500 LCD Kaltlichtquelle	Zeiss, jena
Kryostat HM 500 OM	Microm, Berlin
Melatronic 23 Autoclav	Melag, Berlin
Microtom HM360	Microm, Berlin
Mikroskope: Dialux 20EB	Leitz, Wetzlar
Optical Tech	Optech, Toronto (CA)
Fluovert FU	Leitz, Wetzlar
Axiotech Vario	Zeiss, Oberkochen
Mikroskopkamera DMC 2	Polaroid, Offenbach
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Brand, Giessen
Operationsbesteck	Aesculap Braun, Melsungen
Pipet boy acu	IBS Integra Biosciences
Präzisionswaage BP 21 S	Sartorius, Göttingen
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Schüttler IKA-Vibrax VXR	IKA Labortechnik, Staufen
Sicherheitswerkbank M18	Schulz, Lufttechnik, Sprock

Sony 3CCD Color Video Camera  
 Sterilbank  
 SVHS Video Recorder  
 Vortex Genie 2  
 Waage EG 600-2M  
 Wasserbad  
 Wärmeplatte Monotherm  
  
 Zentrifuge Multifuge 3S-R

Hövel  
 Sony  
 Heraeus, Hanau  
 Panasonic, Osaka (JPN)  
 Roth, Karlsruhe  
 Kern, Ballingen-Frommern  
 Julabo, Seelbach  
 H+P Labortechnik, Ober-  
 schleißheim  
 Heraeus, Hanau

## 2.9 Verbrauchsmaterial

Bepanthen Augen- und Nasensalbe  
 Combitips plus  
 Deckgläser  
 Kanülen  
 Kompressen  
 Kryoröhrchen  
 Nahtmaterial: Prolene 4-0  
                   Vicryl 3-0  
 Pipetten, Costar Stripette  
 Pipettenspitzen epTips filter  
 Polypropylen Zentrifugenröhrchen  
 Sugi Tupfer  
 Skalpelle  
  
 Sterilfilter  
 Wheaton Shorty Vials  
 Wheaton Schraubverschlüsse  
 Zellkulturflaschen  
 Zellkulturschalen  
 Zentrifugenröhrchen

Roche, Grenzach-Wyhlen  
 Eppendorf, Hamburg  
 Roth, Karlsruhe  
 Falcon, Heidelberg  
 Hartmann, Heidenheim  
 Nunc, Naperville  
 Ethicon, Norderstedt  
 Ethicon, Norderstedt  
 Corning, Corning (USA)  
 Eppendorf, Hamburg  
 NeoLab, Heidelberg  
 Kettenbach, Eschenburg  
 Feather Safety Razor  
 Co., Osaka (JPN)  
 Sartorius, Göttingen  
 NeoLab, Heidelberg  
 NeoLab, Heidelberg  
 Sarstedt, Nümbrecht  
 Falcon, Heidelberg  
 Falcon, Heidelberg

## **2.10 Software**

Image J 1.44j

Magellan v6.5

ARKulator

Microsoft Office 2011 für Mac

EndNote X 7.4

NIH, (USA)

Tecan Trading AG (CH)

Dako Cytomation (USA)

Microsoft Deutschland

GmbH, Unterschleißheim

Thomson Reuters (USA)

### 3 Methoden

#### 3.1 Übersicht Versuchsplanung

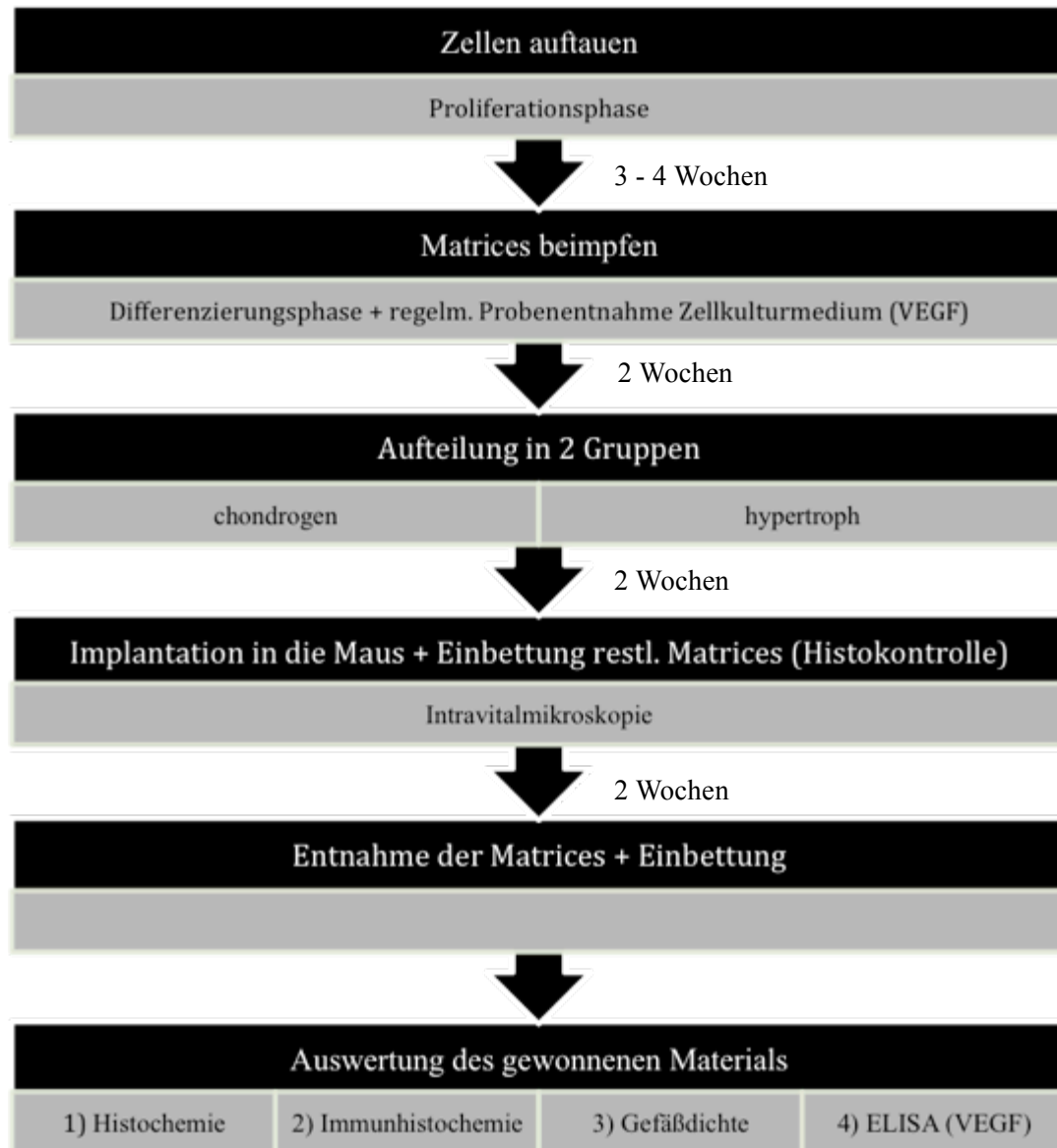


Abbildung 3-1 Schema Versuchsaufbau

## **3.2 Zellkultur**

### **3.2.1 Zellgewinnung und Aufbereitung**

Die während des gesamten Versuchs verwendeten mesenchymalen Stammzellen wurden von Patienten der Abteilung für Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Regensburg gespendet, bei denen eine Beckenkammpunktion als regulärer Bestandteil eines elektiven Eingriffs durchgeführt wurde. Dieses Vorgehen wurde durch eine Ethikkommission genehmigt, die schriftliche Einwilligungserklärung der Spender nach entsprechender Aufklärung über die zusätzliche Entnahme und den Verwendungszweck des Zellmaterials liegt vor.

Das durch eine Punktion nach Jamshidi gewonnene Aspirat von 20 ml Knochenmark wurde unverzüglich in das Zellkulturlabor verbracht, in DMEM-low Glucose Medium bei 4 °C gelagert und dort maximal 6 h nach der Entnahme unter sterilen Bedingungen aufbereitet. Die Aufreinigung erfolgte mittels Ficoll-Separation. Dazu wurde das Zellgemisch 30 min lang bei 800 g zentrifugiert und die Phase mononukleärer Zellen mit Hilfe einer Pipette vom übrigen Punktat isoliert. Es erfolgte das Ausplattieren der Zellen in Kulturflaschen (entsprechend 3.2.1 Expandieren der Zellen). Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen nach der ersten Passage vom Flaschenboden gelöst und nach lichtmikroskopischer Auszählung in der Neubauerzählkammer aliquotiert und für die weitere Verwendung kryokonserviert.

Um eine Beschädigung der Zellen zu verhindern, wurde diesen zuvor FCS im Verhältnis 1:1 zugefügt und im Anschluss direkt vor dem Einfrieren 10 % DMSO zugesetzt. Es handelt sich demzufolge um native Zellen, die vor der eigentlichen Verwendung im Versuch noch passagiert wurden.

### **3.2.2 Auftauen und Expandieren der Zellen**

Die kryokonservierten mesenchymalen Stammzellen wurden von -80 °C zunächst in einem Wasserbad kurz erwärmt, bis der Großteil des Inhalts verflüssigt war. Nach sorgfältiger Desinfektion des Kryoröhrchens wurde dessen gesamter Inhalt in ein DMEM Low Glucose Medium überführt und bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml pro  $2 \times 10^6$  Zellen des zuvor verwendeten Mediums resuspendiert. Die Gesamtzellzahl sowie der prozentuale Anteil toter Zellen wurden lichtmikroskopisch unter Zugabe von Trypanblau (1:1) in der Neubauerzählkammer bestimmt (siehe 3.2.6).

Daraufhin wurden je 200.000 Zellen in einer 75 cm<sup>2</sup> Falcon Zellkulturflasche ausgesät und fortan bei einer Temperatur von 37 °C und einer wasserdampfgesättigten Umgebung mit 5 % CO<sub>2</sub> im Begasungsbrutschrank kultiviert. Sobald eine homogene Adhärenz der Zellen sichtbar

war, wurde das DMEM Low-Gluc Medium zweimal pro Woche erneuert. Dies wurde bis zum Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 - 90 % fortgesetzt, sodass am Ende der Proliferationsphase (2. Passage) durchschnittlich  $1 \times 10^6$  Zellen pro Zellkulturflasche zur Verfügung standen.

### **3.2.3 Auswahl des geeigneten Zellmaterials**

Aus den vorhandenen Kryokonservaten wurden vor Beginn des Versuchs die Zellen fünf verschiedener junger Spender hinsichtlich ihrer Hypertrophierungsfähigkeit getestet. Dazu wurden die jeweiligen Zellen nach erfolgreicher Proliferation vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst, um anschließend in Form von Aggregaten mit Differenzierungsmedien kultiviert werden zu können.

Zum Ansetzen der Aggregate wurde zunächst das Proliferationsmedium abgesaugt und mit PBS-Dulbecco vollständig ausgewaschen. Zum Ablösen des Zellrasens wurden pro Flasche 3 ml Trypsin EDTA verwendet, dessen Wirkung nach lichtmikroskopischer Kontrolle der vollständigen Zellablösung durch Zugabe von 10 ml des FCS haltigen Low-Glucose Mediums abgestoppt wurde. Das resuspendierte Zellmaterial wurde in einem 50 ml Falcon Röhrchen über 10 min mit 1000 U zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml pro  $2 \times 10^6$  Zellen High-Glucose Medium aufgenommen. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl mit der Neubauerzählkammer unter Zugabe von Trypanblau (1:1) (siehe 3.2.6) wurde die Zellsuspension erneut mit 1000 U für 10 min zentrifugiert. Darauffolgend wurden die Zellen in 350 µl Differenzierungsmedium pro 200.000 Zellen aufgenommen und jeweils 200.000 Zellen in ein Well einer 96 Well-Zellkulturplatte (V-förmig) pipettiert, die dann für 5 min bei 2000 U zentrifugiert wurden.

Sämtliche Aggregate wurden unter den genannten Zellkulturbedingungen zunächst 14 Tage mit einem chondrogenen Differenzierungsmedium und im Anschluss daran die Hälfte von ihnen noch weitere 14 Tage mit einem hypertrophieinduzierenden Medium kultiviert. Ein Medienwechsel fand dreimal pro Woche in regelmäßigen Abständen statt. Zur histologischen Beurteilung wurden die Aggregate nach der Entnahme aus den Zellkulturplatten unverzüglich für 1 h in Standardfixans aufgenommen, danach für 20 min in Phosphatpuffer 0.1 M gegeben und jeweils für 1 h zunächst in eine 10 % dann in eine 20 % Saccharoselösung überführt und im Anschluss in einer 30 % Saccharoselösung über Nacht im Kühlschrank belassen. Am Folgetag wurde der Überstand abgesaugt, das Zellaggregat mit Tissue Tek bedeckt und erneut über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Am folgenden Tag wurde das Aggregat für die Bearbeitung mit dem Kryotom in Tissue Tek eingebettet und durch Eintauchen in flüssigen



Stickstoff als Block auf einer Schnitthalterung fixiert. Die Kryoschnitte wurden auf Objektträgern getrocknet, die zuvor mit einer Gelatinelösung präpariert wurden. Anschließend wurden sie mit DMMB und einem Kit zum Nachweis der Alkalischen Phosphatase angefärbt.

### **3.2.4 Beimpfen der Tissue-Engineering Matrices**

Zur späteren Implantation der Zellen in die Maus mussten diese in einer Hyaluronsäurebenzylester-Gelatine-Kompositmatrix immobilisiert werden. Dabei wurde eine eigens dieser Verwendung zugedachte sterile Tissue-Engineering-Matrix mit 5 mm Durchmesser und 4 mm Höhe eingesetzt, die eine patentierte Eigenentwicklung des Labors ist. Zur Vorbereitung wurden die mesenchymalen Stammzellen eines im Vorversuch ausgewählten Spenders am Ende der Proliferierungsphase vom dichtbesiedelten Zellkulturflaschenboden abgelöst. Dazu wurde zunächst das Proliferationsmedium abgesaugt und mit PBS-Dulbecco vollständig ausgewaschen. Pro Flasche wurden dann 3 ml Trypsin EDTA hinzugegeben, dessen Wirkung nach lichtmikroskopischer Kontrolle der vollständigen Zellablösung durch Zugabe von 10 ml des FCS-haltigen Low-Glucose Mediums abgestoppt wurde. Das resuspendierte Zellmaterial wurde in einem 50 ml Falcon Röhrchen über 10 min bei 1000 U zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml pro  $2 \times 10^6$  Zellen High-Glucose Medium aufgenommen. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl (siehe 3.1.3 Lebendzellzahlbestimmung) wurde die Zellsuspension erneut mit 1000 U für 10 min zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt, High Glucose Medium hinzugegeben, sodass eine Konzentration von  $10^6$  Zellen pro 50  $\mu$ l vorlag. Zum Beimpfen des porösen Materials (Porengröße 350 - 430  $\mu$ m) wurde zuvor eine Konstruktion aus einer modifizierten 100  $\mu$ l Eppendorfpipettenspitze als Adapter für die Pipette und einer stumpfen 23 G x 1/2 Kanüle autoclaviert. Diese wurde an zentraler Position in die Matrix eingeführt, sodass durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren von 50  $\mu$ l pro Matrix eine homogene Verteilung bei minimaler Destruktion des Trägermaterials erreicht werden konnte. Daraufhin wurden die zentralständigen Wells einer 24-Well-Platte mit jeweils einer Matrix bestückt, die randständigen Wells zur Aufrechterhaltung der Umgebungsfeuchte mit PBS Puffer befüllt und für 1 h im Brutschrank inkubiert. Durch diesen Schritt wurde ein sofortiges Herauswaschen der Zellen aus der Matrix bei der späteren Befüllung mit 1 ml chondrogenem Medium verhindert.

### 3.2.5 Differenzierung

Die Differenzierung von MSC im Zell-Matrix-Konstrukt fand entsprechend der zuvor an Aggregaten erprobten Methode über 14 Tage ausschließlich mit chondrogenem Medium statt. Danach wurde eine Hälfte weiterhin mit chondrogenem Medium, die andere Hälfte mit einem hypertrophieinduzierendem Medium behandelt. Zusätzlich wurden in diesem Versuchsteil Zellkulturmedienüberstände in regelmäßigen Abständen zur späteren ELISA Analyse bei -80 °C konserviert.

### 3.2.6 Lebendzellzahlbestimmung

Um die tatsächliche Anzahl von  $10^6$  Zellen pro Matrix zu erreichen, wurde vor der Beimpfung eine Kontrolle der Lebendzellzahl durchgeführt. Dazu wurden jeweils 50 µl Trypanblau zu 50 µl des resuspendierten Zellmaterials hinzugegeben. Während lebende Zellen eine intakte Zellmembran aufweisen, die für den Farbstoff kaum permeabel ist, verfügen tote Zellen über eine degenerativ perforierte Zellmembranstruktur, durch die das Trypanblau in die Zelle eindringen kann, sodass sie in der mikroskopischen Einstellung identifizierbar wird.

Die Quantifizierung wurde unter Zuhilfenahme der Neubauerzählkammer vorgenommen.

[93]

$$\text{Teilchen pro } \mu\text{l Volumen} = \frac{\text{ausgezählte Teilchen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} \times \text{Kammertiefe (mm)} \times \text{Verdünnung}}$$

### **3.3 Tierversuch**

#### **3.3.1 Implantation der Zell-Matrixkonstrukte und Rückenhautkammern**

Die Matrices wurden am Tag 28 nach Beimpfung implantiert und hatten bis dahin eine vollständige chondrogene bzw. hypertrophe Differenzierungsphase durchlaufen. Darüber hinaus diente die Implantation zellfreier Matrices als Kontrollgruppe.

Einen Tag vor dem Einbringen des Zell-Matrix-Konstrukts wurden die Versuchstiere für die Implantation präpariert, indem eine Rückenhautfalte mit einer Beobachtungskammer aus Titan fixiert wurde.

Die Versuchstiere waren zum Zeitpunkt der Implantation 10 Wochen alte ausschließlich männliche BALB/c nu/nu Mäuse, die als Voraussetzung für die Operation ein Mindestgewicht von 22 g aufweisen mussten. Leichtere Mäuse dienten später als Erythrozytenspender für die Fluoreszenzmarkierung. Die Tiere wurden von Beginn an isoliert gehalten, um zu verhindern, dass sie sich gegenseitig Verletzungen der Haut zufügen, die Vernarbungen oder Entzündungsreaktionen hätten hervorrufen können. Im Wärmeschrank untergebracht erhielten sie eine speziesspezifische Standarddiät und Leitungswasser ad libitum bei einem 12 h hell-dunkel-Rhythmus.

Im Voraus wurden die verwendeten Titankammern samt Deckgläsern autoclaviert, ebenso wurde mit sterilen mikrochirurgischen Instrumenten gearbeitet. Die Operationsbedingungen bedurften hingegen keiner Asepsis und konnten im Tier-OP unter Nutzung eines Stereomikroskops durchgeführt werden. [87]

Für das Procedere wurden die Mäuse eingangs mit einer intraperitonealen Injektion von Xylazin und Ketamin (0,1 ml Xylazin 2 %, 0,4 ml Ketamin 10 % ad 1 ml NaCl) unter Erhalt der Spontanatmung analgosediert. Die Hornhaut des Auges wurde mit Augensalbe vor Austrocknung geschützt und die Maus mit einer Unterlage aus Kompressen auf eine Wärmeplatte gebettet. Die Atmung der Maus wurde visuell überwacht und bei Interventionsbedarf Sauerstoff durch einen vorgehaltenen Schlauch zugeführt. Bei ausreichender Narkosetiefe wurde zunächst eine Rückenhautfalte mittig durch zwei Nähte fixiert, wobei sich die Faltenbildung an der deckungsgleichen Ausrichtung der Gefäßstrukturen beider Seiten in der Diaphanoskopie orientierte. Nachdem diese Nähte der Straffung der Haut für die weiteren Schritte dienten, wurde im Folgenden der hintere Teil der Titankammer durch zwei mediale Nähte fixiert (siehe Abb. 3-2). Um eine direkte Sicht auf die subcutanen Blutgefäße zu erhalten, wurde eine Aussparung in Größe der Kammerfensterung in die zugewandte Hautfaltenseite geschnitten und das darunterliegende Bindegewebe der abgewandten Seite mitsamt subcutanem Fett unter

Schonung der darunterliegenden Gefäßstrukturen entfernt. Im Anschluss wurde der erste Teil der Kammer an der abgewandten Seite angepasst und durch eine zweifache Annaht an der Haut fixiert. Darauf wurde die Kammervorderseite aufgesetzt und durch jeweils zwei mediale und laterale Nähte durch Haut und Kammerhinterseite sowie durch zwei Schraubenmuttern fixiert. Zuletzt wurde das Beobachtungsfenster durch ein Deckglas unter Ausschluss von Luftblasen verschlossen. Dieses konnte am darauffolgenden Tag zum Einbringen der Matrix erneut geöffnet werden.

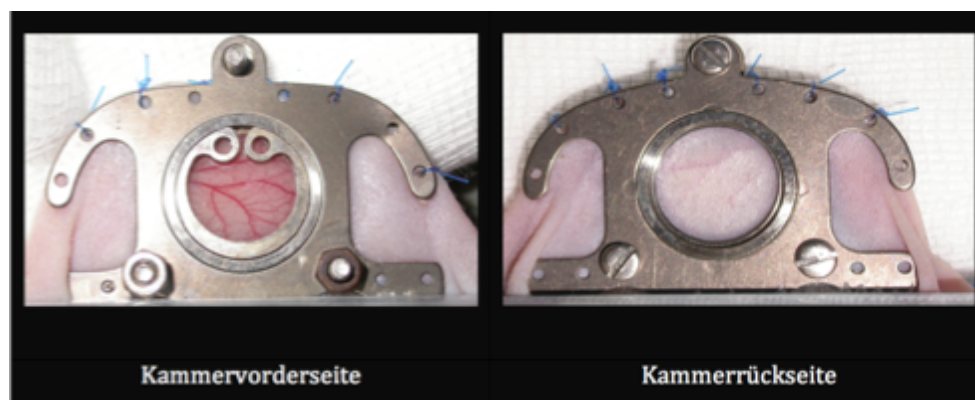


Abbildung 3-2 Ansicht Rückenhautkammer

### 3.3.2 Intravitalmikroskopie

Die intravitalmikroskopischen Beobachtungen wurden vom Zeitpunkt der Matriximplantation an täglich durchgeführt und mit Hilfe eines Kamerasystems in Snapshottechnik in 5x und 10x Vergrößerung zur späteren Auswertung dokumentiert. Dazu wurden die Mäuse in Plexiglasröhren immobilisiert, die in eine Vorrichtung am Mikroskop gespannt werden konnten. Eine Sedierung war für das Mikroskopieren nicht notwendig, da sich die Mäuse ihrem Instinkt folgend bei leichter Verdunklung eigenständig in die Röhren bewegten, sodass diese lediglich so positioniert werden mussten, dass Rückenhautkammern in die vorgesehene Schlitzung gelangten.

Je nach Verlauf wurden die Beobachtungen bis maximal 12 Tage durchgeführt und die Maus nach Entnahme der Matrix durch Diethyläther betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet.

### 3.3.3 Bestimmung der Gefäßdichte und –funktionalität

Nach Abschluss des Beobachtungszeitraums wurde das gewonnene Bildmaterial manuell ausgewertet. Unter Verwendung des Programms ImageJ wurde nach Eingabe der am Mikroskop eingestellten Parameter eine Fläche ( $\text{mm}^2$ ) sowie die Gesamtlänge (mm) der darin verlaufenden Gefäße gemessen. Aus diesen beiden Größen wurde die Gefäßdichte in ( $\text{mm}/\text{mm}^2$  oder  $\text{mm}^{-1}$ ) errechnet und ein Vergleich im zeitlichen Verlauf angestellt. Die beiden zu analysierenden Flächen wurden nach Sichtung des Materials wie folgt festgelegt: Der Bereich zwischen Matrixrand und einem Abstand von  $50\ \mu\text{m}$  wurde als Angiogenesezone definiert und zum Vergleich die gesamte einsehbare Fläche jenseits des Matrixabstands von  $50\ \mu\text{m}$  zur Darstellung des allgemeinen Gefäßstatus in der Kammer herangezogen. Diese Bereiche sind in Abb. 3-3 als Angiogenesezone und Restfläche mitsamt den Vermessungsmarkierungen dargestellt.

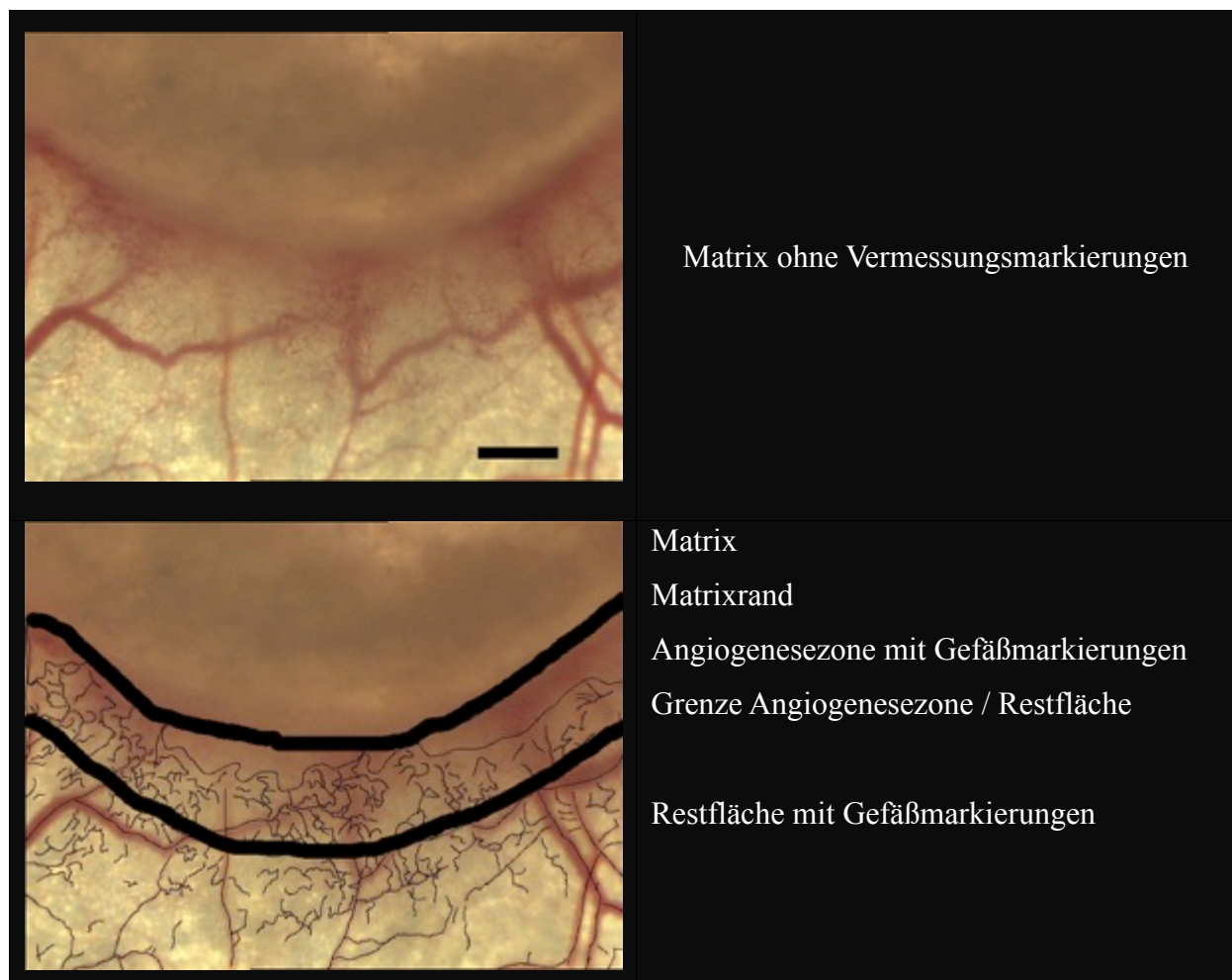


Abbildung 3-3 Schema zur Vermessung der Gefäßdichte, 2,5x Vergrößerung, Maßstab =  $500\ \mu\text{m}$  (oberes Bild)

Zur Beurteilung der Gefäßfunktionalität wurden einzelnen Tieren fluoreszenzmarkierte Erythrozyten in die Schwanzvene injiziert. Daraufhin zirkulierten sie der natürlichen Abbauphase eines Erythrozyten entsprechend fortan bis zum Versuchsende im Gefäßsystem der Maus und konnten unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops und einer Fluoreszenzlampe sichtbar gemacht werden. Diese Beobachtung wurde sowohl in Einzelbildern als auch als Videoaufnahme dokumentiert. Zur Gewinnung von Erythrozyten dienten nichtoperierte Balb/c nu/nu Mäuse gleichen Alters, deren Vena Cava inferior unter Narkose mit einer heparinisierten 27 G Kanüle punktiert wurde. Im Anschluss wurden die betäubten Tiere durch zervikale Dislokation getötet und das Punktat mit PBS Puffer bei 1500 U zentrifugiert, zweimal unter erneuter Zentrifugation mit PBS Puffer gewaschen. Nach erfolgreicher Isolierung der Erythrozyten wurden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH67 aus dem Green Fluorescent Cell Linker Kit von Sigma markiert. Drei Waschungen mit PBS Puffer unter Zentrifugation bei 1500 U / min folgten, woraufhin die Erythrozytenkonzentration durch Auszählung in der Neubauerkammer ermittelt wurde und somit die Anzahl von  $100 \times 10^6$  markierte Erythrozyten pro Tier in die Schwanzvene injiziert wurden.

### **3.4 Analyse des gewonnen Materials**

#### **3.4.1 Histologie**

##### **3.4.1.1 Gewebeaufbereitung**

Die im Vorversuch angelegten Aggregate sowie die Matrices, die nach Abschluss der Zellkulturphase lediglich als histologische Kontrolle vor Implantation der restlichen Matrices in die Maus dienten, wurden im ersten Schritt für 60 min mit Standardfixans ohne Glutaraldehyd fixiert. Dieses wurde im Anschluss für 20 min mit einem 0,1 M Phosphatpuffer ausgewaschen und die Proben für jeweils 1 h in einer aufsteigenden Saccharose-Reihe (10 %, 20 % und 30 %) fixiert. Für Matrices betrug die Dauer dieser Arbeitsschritte aufgrund ihrer Größe im Vergleich zu den Aggregaten jeweils das Dreifache der vorangegangenen Zeitangaben. Anschließend wurde die 30 %-ige Saccharose bis auf einen kleinen Rest abgenommen und mit Tissue Tek bedeckt über Nacht im Kühlschrank belassen. Zuletzt wurden die Proben in reines Tissue Tek eingebettet, das mit dem Boden der Gießvorrichtung in flüssigen Stickstoff eingeführt wurde und durch die Temperatureinwirkung aushärtete.

Bei den Matrices, die bei Versuchsende aus der Maus entnommen wurden, wurde im Hinblick auf die spätere CD31 Immunhistochemie auf die Fixierung verzichtet. Stattdessen erfolgten

hier unverzüglich nach der Entnahme die Einbettung mit Tissue Tek und die anschließende Aushärtung in flüssigem Stickstoff.

Mit dem Gefriermikrotom wurden Schnitte mit einer Schichtdicke von 12 µm angefertigt, auf die zuvor mit Gelatine präparierten Objektträger übertragen und bei Raumluft unter dem Abzug getrocknet.

#### **3.4.1.2 DMMB (Dimethylmethylenblau)**

Die DMMB-Färbung ermöglicht den qualitativen Nachweis von Glycosaminoglycanen in der extrazellulären Matrix, die durch eine Komplexbildung mit Methylenblau in violetter Färbung dargestellt werden.

Im ersten Schritt wurden die ausgewählten Schnitte für 5 min in Aqua dest. rehydriert und Tissue Tek ausgewaschen. Anschließend wurde die Glasküvette mit den Schnitten unter dem Abzug in 0,1 % DMMB umgesetzt und dort für ebenfalls 5 min belassen. Es folgte ein mehrmaliges Auswaschen des nichtgebundenen Methylenblau mit Aqua dest., sowie die schrittweise Dehydrierung in einer aufsteigenden Propanolreihe (2 x 5 min 90 %, 2 x 5 min 96 %, 2 x 5 min 100 %) sowie zuletzt 2 x 5 min in Xylol. Abschließend wurden die Schnitte mittels DePex und einem Deckglas luftfrei eingeschlossen.

#### **3.4.1.3 Alkalische Phosphatase**

Der qualitative Nachweis der alkalischen Phosphatase (AP) als Hypertrophiemarker wurde mit dem Alkaline Phosphatase Diagnostic Kit durchgeführt. Begonnen wurde dazu ebenfalls mit dem Auswaschen von Tissue Tek aus den Schnitten durch Aqua dest. Währenddessen wurden 1 ml der Natrium Nitrit Lösung mit 1 ml der FBB-Alkaline-Lösung für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin in 45 ml Aqua dest. aufgenommen. Bevor die rehydrierten Schnitte für 15 min mit dieser Lösung bestückt wurden, wurde noch 1 ml der Naphtol AS-BI Alkaline Solution hinzugefügt. Dieser Schritt erfolgte aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Lösung unter einer Abdeckung. Danach wurden die Schnitte zweimal mit Aqua dest. gespült und zur Gegenfärbung 2 min mit der Neutral Red Solution inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte erneut zweimal mit Aqua dest. gespült und zunächst mit Karion wässrig eingedeckelt, bevor am folgenden Tag der Einschluss mittels Deckglas und DePex erfolgte und die Schnitte zeitnah abphotographiert wurden.

### **3.4.2 Immunohistochemie**

Zur qualitativen Detektion von Markern der chondrogenen und hypertrophen Differenzierung wurden das Vorkommen und die Verteilung von Kollagen I, II und X in den entnommenen Geweben immunhistochemisch erfasst. Die Erfassung von Gefäßstrukturen erfolgte mittels CD31-Färbung.

Dabei wurde ein gegen das zu untersuchende Antigen gerichteter Primärantikörper eingesetzt, der entweder selbst biotinyliert war, oder in Kombination mit einem passenden biotinylierten Sekundärantikörper verwendet wurde. Letzterer bindet an das Fc-Fragment des Primärantikörpers. Durch die Kopplung an Biotin, das wiederum eine hohe Affinität für Avidinstrukturen aufweist, gelingt es, das Signal in der Farbreaktion zu verstärken und so lichtmikroskopisch sichtbar zu machen. Diese Farbreaktion kommt durch die enzymatische Spaltung des Chromogens DAB durch die streptavidin gebundene Meerrettichperoxidase zustande.

#### **3.4.2.1 Kollagen Typ I, II und X**

Das Vorgehen für die immunhistochemische Färbung von Kollagen I, II und X unterschied sich abgesehen von der Verwendung unterschiedlicher Antikörper nur geringfügig.

Zu Beginn wurden die Schnitte für 10 min in Waschpuffer rehydriert, für 30 s in Standardfixans fixiert und erneut 5 min in Waschpuffer gewaschen. Zum Blockieren der endogenen Peroxidasen wurden die Schnitte für 30 min in 3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  / 10 % MetOH und PBS inkubiert und wiederum 5 min in Waschpuffer gegeben. Von dort erfolgte das luftblasenfreie Einspannen der Objektträger in Einzelhalterungen, sodass die Bestückung der Schnitte genauer dosierbar war und gleichzeitig ein Austrocknen verhindert wurde. Erst nach sorgfältiger Prüfung der Dichtigkeit der Apparaturen durch erneutes Spülen mit je 1 ml Waschpuffer, wurden pro Schnitt 150  $\mu\text{l}$  der Pepsinandauflösung hinzugefügt. Diese wurde nach 15 min durch dreimaliges Auswaschen mit Waschpuffer entfernt und die Objektträger aus den Halterungen für 30 min in einer Glasküvette mit 1 % Triton X-100 in PBS inkubiert. Die Objektträger wurden daraufhin wieder in die Halterungen gespannt und für 1 h mit je 150  $\mu\text{l}$  Fab-Blockingpuffer bestückt. Es erfolgte die Postfixation für 30 s in Standardfixans in der Glasküvette sowie 5 min im Waschpuffer, mit dem die Objektträger erneut eingespannt wurden. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die biotinylierten Primärantikörper sowie MOPC21 für die Isotypkontrolle mit 100  $\mu\text{l}$  / Schnitt hinzugefügt.



Für die Berechnung der Konzentrationen von Antikörper, Diluens, Biotinylierungsreagenz und Blockingreagenz in Abhängigkeit der zu färbenden Schnitte wurde die zum verwendeten DakoKit gehörige Software „ARKulator, Dako Cytomation“ genutzt.

Verwendete Primärantikörper:

Coll I: Mouse anti human IgG, 1:20,

Coll II: Mouse anti human IgG 1:10

Coll X: Mouse anti human IgG 1:50

Im Gegensatz zu den Primärantikörpern für Kollagen I und II wurde der Antikörper für Kollagen X über Nacht bei 4 °C belassen und erst danach ausgewaschen und das Protokoll fortgesetzt. Bei den Färbungen Kollagen I und II hingegen wurden die Schnitte bereits nach 15 min Inkubationszeit mit Waschpuffer gewaschen und für 1h mit 150 µl pro Schnitt ABC-Komplex inkubiert. Danach wurden die Objektträger aus den Halterungen entnommen, in Waschpuffer aufgenommen und zur Entwicklung mit DAB unter dem Abzug positioniert. Die Schnitte wurden dazu aus der Küvette herausgenommen, waagrecht aufgelegt und der Schnitt vollständig mit der DAB-Arbeitslösung bedeckt. Die Farbreaktion wurde soweit nicht bereits makroskopisch sichtbar, mikroskopisch kontrolliert, das DAB nach Entsorgungsvorschrift entfernt und die Schnitte im Waschpuffer gesammelt. Es folgte die aufsteigende Propanolreihe, Xylol und die Eindeckelung mit DePex.

#### **3.4.2.2 CD31**

CD31, oder auch PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) ist ein auf allen kontinuierlichen, nicht jedoch auf diskontinuierlichen Endothelzellen exprimiertes Transmembranprotein, [15, 94] das zum Nachweis von Gefäßen geeignet ist. [95] Da es sich bei den nachzuweisenden Strukturen um Gefäße handelt, die vom Spenderorganismus, der Maus, in die Matrix einwachsen, wurde ein Rat-anti-mouse-Primärantikörper verwendet.

Entsprechend den Herstellerangaben war eine vorangegangene Formaldehyd-Fixierung des Gewebes zwar geeignet für eine spätere Verwendung des CD31-Antikörpers, [15] Vorerfahrungen in der Arbeit mit dem spezifischen Antikörper zeigten jedoch bessere Ergebnisse bei einem Verzicht auf Formaldehyd. Deshalb wurde zunächst vollständig auf eine Fixierung verzichtet und die Einbettung im Tissue Tek Block mit flüssigem Stickstoff unmittelbar nach der Entnahme durchgeführt. Die benötigten Schnitte für den Versuch wurden daher erst am Tag der Färbung am Kryotom angefertigt. Im Gegensatz zu den anderen immunhistochemischen Färbungen musste nun auch auf das formaldehydhaltige Standardfixans im ersten Schritt ver-

zichtet werden, sodass stattdessen eine Aceton/Chloroformfixierung durchgeführt wurde. Dazu wurde Aceton im Voraus auf Eis gekühlt und die Schnitte nach kurzem Antauen unter dem Abzug für 5 min in einer mit Parafilm abgedichteten Glasküvette mit 100 % Aceton belassen. Es folgten 5 min in Aceton/Chloroform 1:1 und anschließend erneut 5 min in reinem Aceton. Nach der Fixierung wurden die Schnitte in Waschpuffer gespült und für 30 min im Peroxidaseblock (3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 % Methanol in PBS) belassen. Es erfolgte ein erneutes Waschpufferbad und das Einspannen in die Einzelhalter unter Kontrolle der Dichtigkeit. Pro Schnitt wurden 150 µl Blockingpuffer + 10 % Rabbit-Serum für 1 h aufgetragen und danach direkt ohne weitere Spülung der CD31 Antikörper 1:100 in Blockingpuffer inklusive 10 % Rabbit-Serum mit 100 µl pro Schnitt hinzugefügt und über Nacht inkubiert. Für die Negativkontrollen wurde anstelle des Antikörpers lediglich der Blockingpuffer über Nacht belassen. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte dreimal mit Waschpuffer gewaschen und der biotinylierte Sekundärantikörper Rabbit-anti-rat 1:100 in Blockingpuffer inklusive 10 % Rabbit-Serum mit 100 µl pro Schnitt hinzugegeben und für 1 h dort belassen. Es folgte dreimaliges Waschen mit Waschpuffer sowie das Hinzufügen der zuvor angesetzten ABC Lösung für 90 min. Abschließend folgten ein dreimaliges Waschen im Waschpuffer, die Entwicklung unter dem Abzug mit DAB unter intermittierender mikroskopischer Kontrolle, die Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe sowie die Eindeckelung mit DePex.

### **3.4.3 Immunoassay Verfahren ELISA**

Der Enzymelinked Immunoassay wurde zum Nachweis von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) im entnommenen Zellkulturmedienüberstand durchgeführt. Das Verwendete DuoSet ELISA Development Kit für human VEGF von R&D basiert auf dem Sandwich-Prinzip. Dabei wird ein Antikörper an der Wand der Mikrotiterplatte immobilisiert (Capture Antibody), der die antigenhaltigen Bestandteile der zu analysierenden Probelösung bindet. In einem weiteren Schritt wird ein zweiter Antikörper (Detection Antibody) hinzugegeben, der ebenfalls an die mittlerweile immobilisierten Antigene bindet und durch seine Biotinylierung zusammen mit einer streptavidin gebundenen Peroxidase und einem Chromogen nachgewiesen werden kann. Quantifiziert wird dieser Nachweis photometrisch über die durch den Farbumschlag hervorgerufene Trübung der Lösung.

Pro Gruppe wurden die Proben von acht verschiedenen Matrices analysiert, wobei für den ELISA die Überstände eines Entnahmezeitpunkts von jeweils zwei Matrices der gleichen

Gruppe gepoolt wurden und der Tag 4 als erster Entnahmezeitpunkt nach dem Beimpfen der Matrices für alle Proben gepoolt wurde.

Ab dem Zeitpunkt der Matrixbeimpfung wurden beim Medienwechsel der folgenden 4 Wochen einmal wöchentlich Überstände abgenommen und bis zur Analyse bei -80 °C konserviert. Insgesamt wurden alle 16 Matrices für zwei Wochen mit chondrogenem Medium und im Anschluss für zwei Wochen jeweils 8 Matrices mit Medium für chondrogene und hypertrophe Zelldifferenzierung kultiviert. Zu Analysezwecken wurden die Überstände von je zwei Matrices gleicher Differenzierungsart gepoolt, sodass die Anzahl der Proben auf 8 pro Entnahmezeitpunkt reduziert wurde. An Tag 4 als erstem Entnahmezeitpunkt nach dem Beimpfen der Matrices wurden die Proben aller Matrices gepoolt.

Zum Auftragen der Proben wurde eine 96-Well Microplatte verwendet. Diese wurde am ersten Tag mit 100 µl pro Well mit dem Capture Antibody (Part 841495, 1 µg/ml in PBS) bestückt und über Nacht bei Raumtemperatur sicher verschlossen unter gleichmäßigem Schwenken inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Wells dreimal mit Waschpuffer gespült und auf einem Zellstoffhandtuch schwingvoll ausgeklopft. Anschließend wurde die Platte zum Blocking mit 300 µl Reagent Diluent pro Well für 1 h befüllt und der vorangegangene Waschschrift wiederholt. Danach erfolgte das Auftragen des Standards, der Proben und des Reagent Diluents als Extinktionsabgleich mit 100 µl pro Well, wobei jeweils drei Wells mit der gleichen Probe und Konzentration zur Ermittlung eines Durchschnittswertes angelegt wurden. Zuvor war aus dem mitgelieferten Standard für humanes VEGF (Part 840164) eine Verdünnungsreihe (2000 / 1000 / 500 / 250 / 125 / 62,5 / 31,25 pg/ml) angelegt und eine Verdünnung der Proben 1:10, 1:100 und 1:1000 vorbereitet worden. Nach vollständigem Auftragen wurde die Platte abgedeckt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden dann 100 µl des Detection Antikörpers (Part 840163, 100 ng/ml in Reagent Diluent) hinzugefügt und wiederum 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut wurde die Platte gewaschen und mit 100 µl pro Well Streptavidin (Part 890803, 50 µl / 10 ml, 1 % BSA) für 20 min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden 100 µl pro Well Substratlösung hinzugegeben und die Reaktion unter Lichtschutz nach 20 min mit 50 µl der Stopplösung pro Well und gründlicher Durchmischung abgestoppt. Zur Ermittlung der Einzelwerte wurde die Platte direkt im Anschluss mit einem ELISA Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer eingestellten Wellenlängenkorrektur bei 540 nm gemessen und durch Voreinstellungen Analysesoftware Magellan v6.5 von Tecan verarbeitet.

### **3.5 Statistik**

Bezogen auf die gemessenen Einzelwerte wurden das gruppenspezifische arithmetische Mittel sowie die sich ergebende Standardabweichung im Sinne einer deskriptiven Statistik bestimmt. Daran anschließend als Teil der induktiven Statistik ein Signifikanztest (t-Test). Für die statistische Analyse und die graphische Darstellung des Datenmaterials wurde Microsoft Excel verwendet.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Vorversuche**

Im Vorversuch wurden verschiedene Zelllinien im Hinblick auf ihre Differenzierungsfähigkeit im Zellaggregat getestet. Aus diesen wurde die für sämtliche Versuche verwendete Zelllinie LN-714 ausgewählt, die einem männlichen Spender im Alter von 19 Jahren entnommen wurde. Die hypertroph differenzierten Zellaggregate zeigten gegenüber den chondrogen differenzierten eine deutliche Zunahme des Zellvolumens und wiesen in der DMMB- und der AP-Färbung histologische Charakteristika einer erfolgreichen Differenzierung auf.

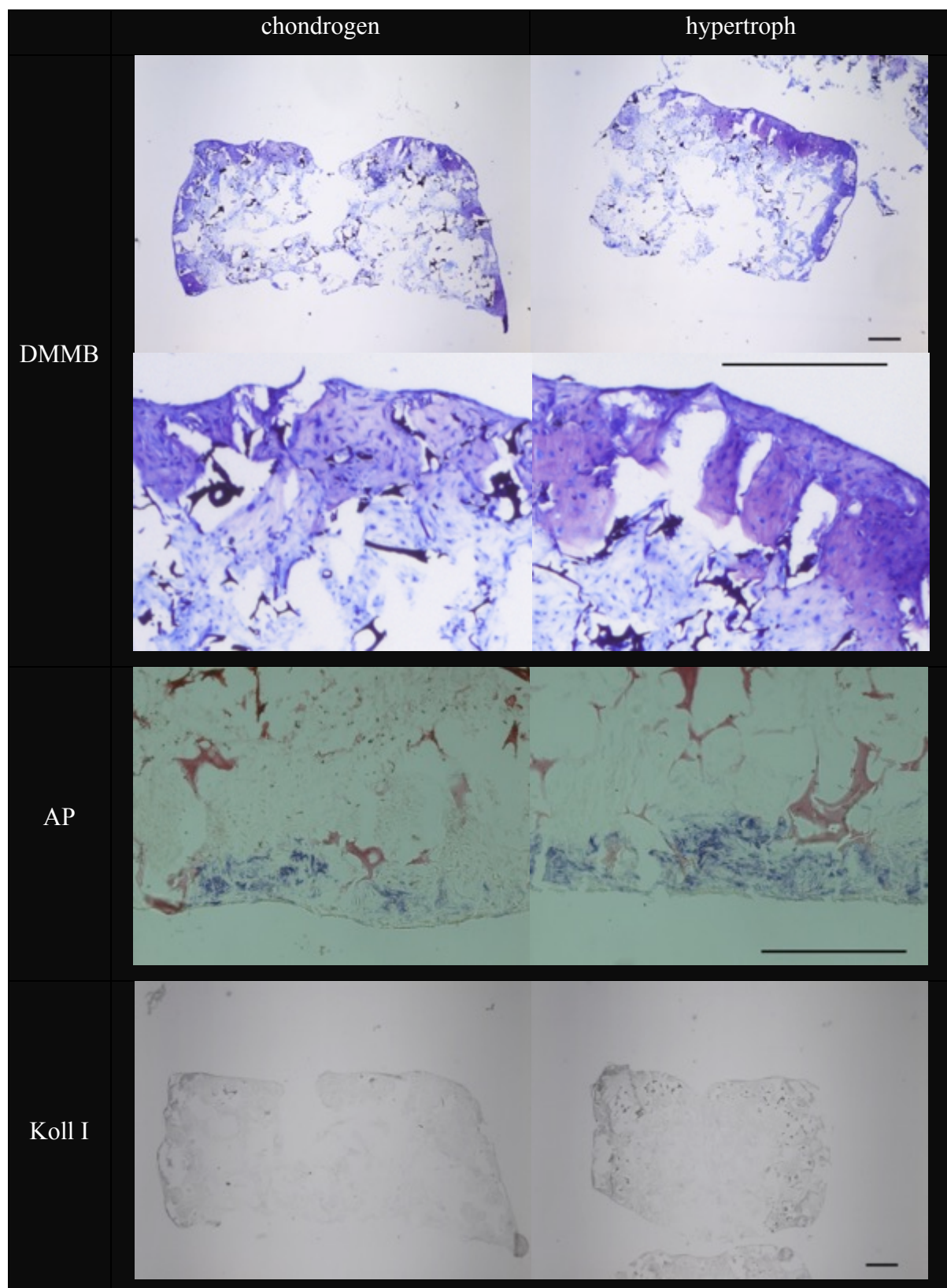
### **4.2 Feststellen des Differenzierungsgrades**

Zur Feststellung der erfolgreichen Zelldifferenzierung im Trägermaterial wurden die Matrices nach Abschluss der Differenzierungsphase am Tag 28 histologisch aufgearbeitet. Insgesamt wurde der Versuch einmal wiederholt und pro Durchgang wurden zwei Matrices pro Gruppe ausschließlich für die Histologie verwendet. Der Nachweis von Zellen war in der gesamten Matrix positiv, wenn auch in mitunter ungleicher Verteilung zugunsten des Randbereichs. Auffällig war insbesondere, dass sich die Nachweisbarkeit einer Differenzierung in allen Färbungen auf den Randbereich beschränkte. Dabei war in einigen Fällen auch nur eine Seite der kreisrunden Matrixoberfläche betroffen, sowie ihr gesamter seitlicher Randbereich, wie sich an den abgebildeten Schnitten zeigt (siehe Abb. 4-1). Die zentrale Einkerbung der Matrix ist durch die Beimpfung zu erklären, bei der die Kanüle in die Matrixmitte eingeführt wurde.

In der DMMB-Färbung zeigte sich der Randbereich kräftig angefärbt, wodurch eine glykosaminoglykanreiche Extrazellulärmatrix nachgewiesen wurde. Insgesamt erschien die Anfärbbarkeit bei der hypertrophen Gruppe ausgeprägter. Das Matrixinnere hingegen imponierte nur leicht bläulich, sodass hier keine hyaline Knorpelmatrix zu vermuten war.

Die Anfärbung der Alkalischen Phosphatase war in der hypertrophen Gruppe stärker und kontinuierlicher ausgeprägt als in der chondrogenen Vergleichsgruppe, bei der lediglich vereinzelt kleine voneinander abgegrenzte Areale am Matrixrand dargestellt werden konnten.

Immunhistochemisch war die Anfärbbarkeit des im differenzierten Knorpel vorhandenen Kollagen II in beiden Gruppen deutlich positiv. In deutlich geringerem Maß konnte Kollagen I nachgewiesen werden, wobei hier auch die Matrix selbst als Kollagen-I-haltiges Trägergerüst erfasst wurde. Kollagen X war fast ausschließlich in der Hypertrophiegruppe deutlich nachweisbar und eindeutig von der Hintergrundfärbung abgrenzbar. Es zeigte sich eine breite randständig betonte Verteilung



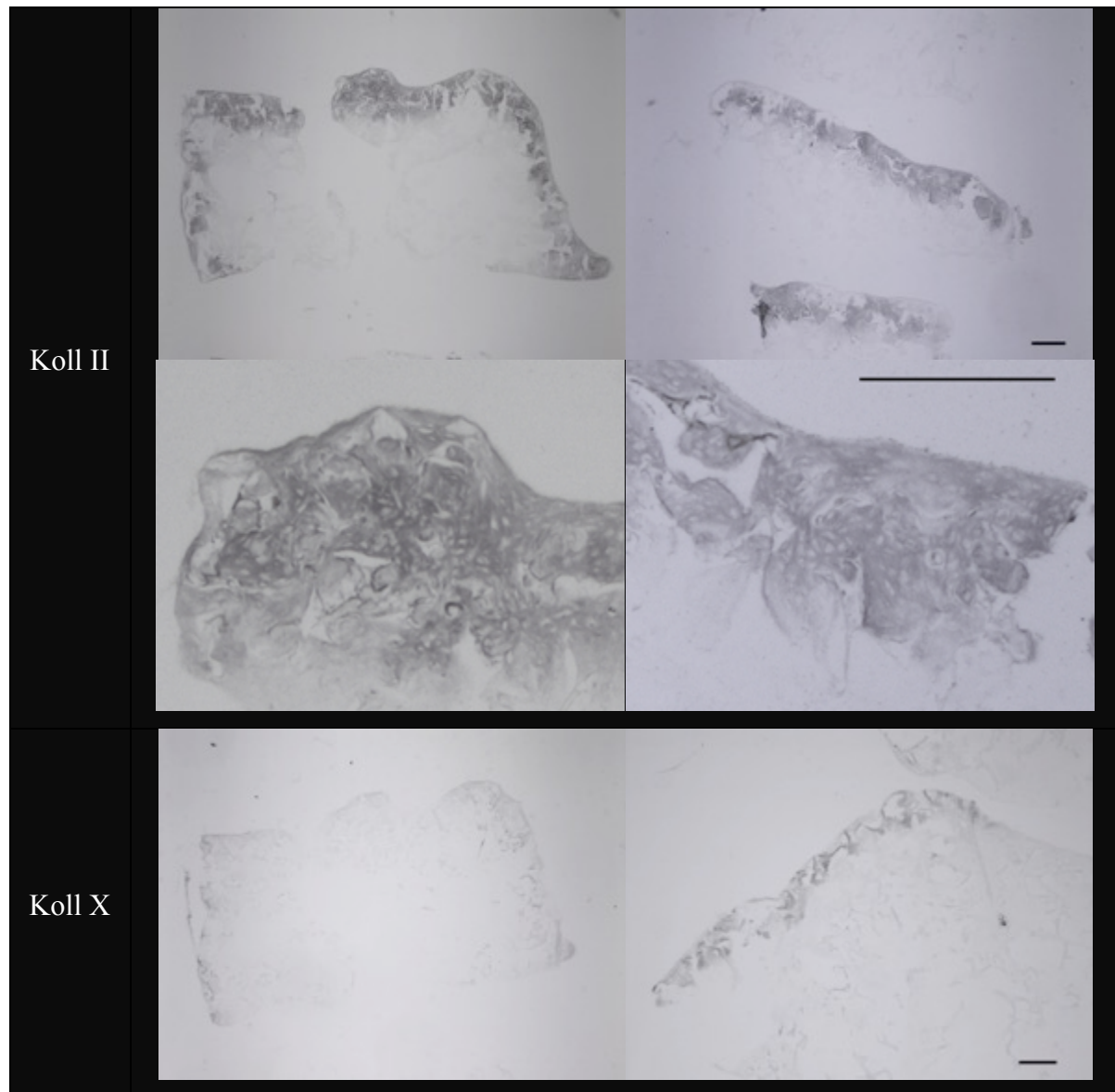


Abbildung 4-1 Übersicht Immunhistochemie am Ende der Differenzierungsphase, DMMB und Kollagen Vergrößerung 2x, AP Vergrößerung 10x, Maßstab = 500 µm

#### 4.2.1 ELISA VEGF Zellkulturmedienüberstand

Als Einflussfaktor auf die Angiogenese spielt VEGF eine entscheidende Rolle. [41, 96-99] Um die Produktion des Faktors durch die Zellen qualitativ nachzuweisen und eine quantitative Aussage zur Vergleichbarkeit der beiden Gruppen treffen zu können, wurde die Konzentration von VEGF im Zellkulturmedium der beimpften Matrices daher im Verlauf von 27 Tagen einmal wöchentlich beim Medienwechsel aus dem 48 h - Überstand bestimmt. Im Diagramm sind die Mittelwerte nach Gruppen sortiert dargestellt. Ein hypertrophieinduzierendes Medi-

um wurde erst ab Tag 13 verwendet, zuvor erhielten beide Gruppen ein Medium für chondrogenes Wachstum.

Die Konzentration von VEGF (Abb. 4-2) wurde bei der Ausgangsmessung an Tag 4 zunächst für alle Matrices einheitlich erfasst (11883 pg/ml). Bis zum Zeitpunkt unmittelbar vor dem Einsatz unterschiedlicher Differenzierungsmedien wiesen die den unterschiedlichen Gruppen zugeordneten Matrices keinen signifikanten Unterschied in der VEGF Produktion (10176 pg/ml bzw. 11508 pg/ml an Tag 6 und 6593 pg/ml bzw. 6298 pg/ml an Tag 13) auf, zeigten jedoch innerhalb der ersten beiden Wochen einen deutlichen Abfall auf 55 % bzw. 53 % des Ausgangswerts von Tag 4.

Nach einer weiteren Woche wurde am Tag 20 die geringste VEGF Sekretion des gesamten Verlaufs gemessen. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Gruppen bereits seit 7 Tagen mit unterschiedlichen Medien kultiviert. Für die Gruppe mit Hypertrophieinduktion wurde mit 44 % vom Ausgangswert (5276 pg/ml) ein deutlich geringerer Abfall im Vergleich zur Gruppe mit weiterhin chondrogener Differenzierung gemessen, bei der die Konzentration am Tag 20 lediglich 29 % des Ausgangswerts betrug (3490 pg/ml). Am letzten Tag stieg die VEGF Sekretion bei beiden Gruppen wieder leicht an. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war zu keinem Zeitpunkt signifikant ( $p > 0,05$ ).

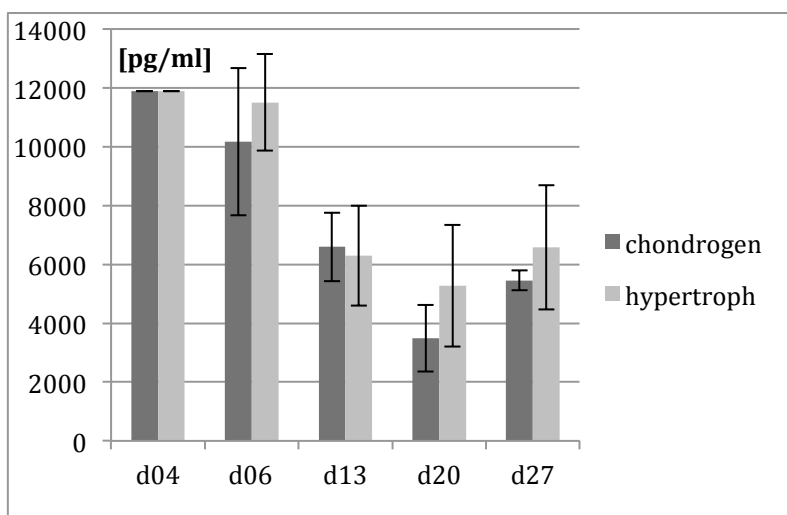


Abbildung 4-2  
VEGF-Konzentration im Medium



### 4.3 Einfluss der Zelldifferenzierung auf die Angiogenese in vivo

#### 4.3.1 Intravitalmikroskopie

Um die angiotaktische Reaktion auf die implantierten Zell-Matrix-Produkte unterschiedlicher Differenzierung bestimmen zu können, wurden in einem Versuch 6 Matrices pro Gruppe sowie eine zellfreie Matrix zur Kontrolle implantiert und über maximal 11 Tage in Folge beobachtet. Insgesamt wurden zwei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Die Matrix selbst war optisch nicht durchdringbar, sodass nur der Matrixrand mikroskopisch analysiert werden konnte. Auch wurde die Haut durch die Höhe der Matrix unter dem Deckglas der Kammer trichterförmig nach hinten gewölbt (siehe Abb. 4-3 Rückseite post Implant.), wodurch keine einheitlich fokussierbare Ebene existierte und die Messungen anhand präzise aufeinander abgestimmter Einzelbilder erfolgten.

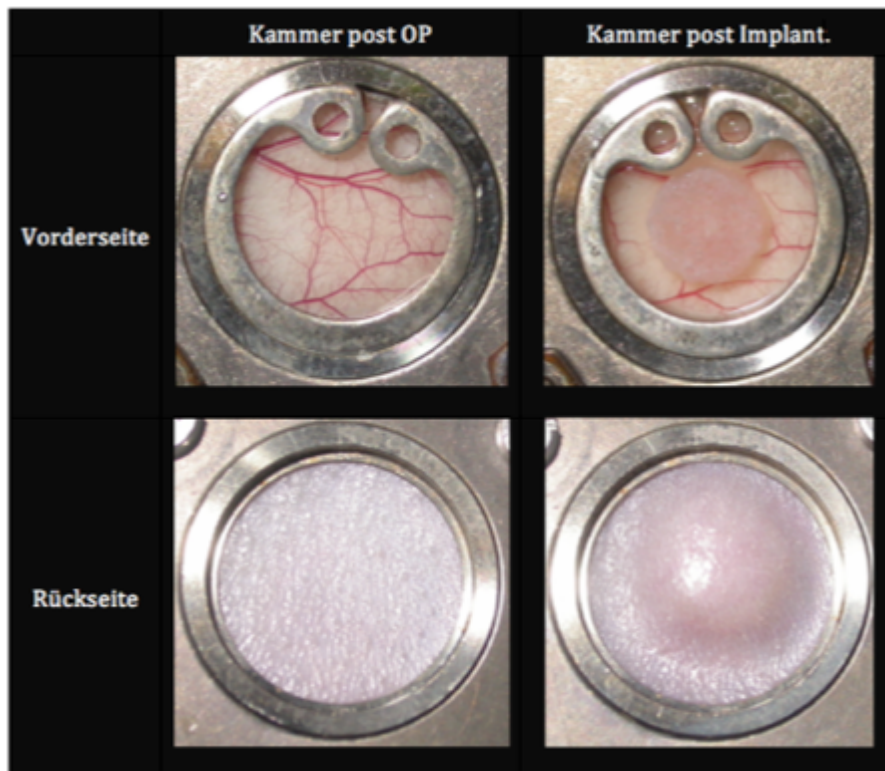


Abbildung 4-3 Rückenhautkammer und Matriximplantation

Im Verlauf schieden 65 % aller Versuchstiere bis zum Tag 8 wegen mangelnder Mikroskopierbarkeit aus dem Versuch aus. Insbesondere die implantierten Leermatrices führten innerhalb der ersten 5 Tage zu Trübungen in der Kammer, sodass diese Gruppe jeweils frühzeitig aus der Beobachtung ausschied. In Abb. 4-4 ist für jede Gruppe beispielhaft ein Verlauf dargestellt, der für eine spätere Vermessung geeignet war.

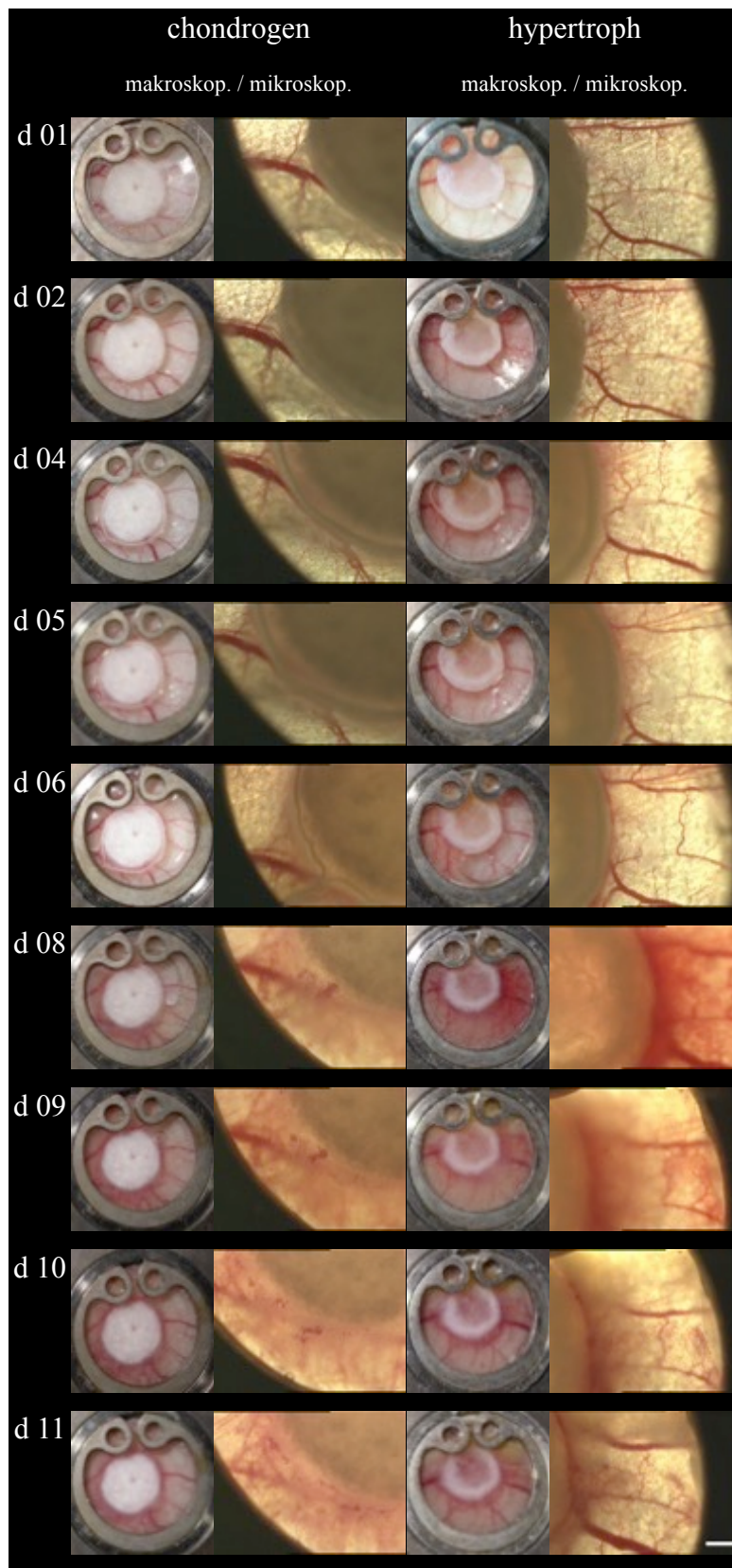


Abbildung 4-4 Übersicht Intra-  
vitalmikroskopie d1 bis d11,  
makroskopisch und mikrosko-  
pischer Ausschnitt Vergröße-  
rung 2,5x, Maßstab (weiß) =  
500  $\mu$ m

#### 4.3.1.1 Gefäßdichte

Am Tag der Implantation (Tag 0) war das einsehbare Gewebe sämtlicher Kammern frei von Irritationen (Vgl. Abb. 4-3). Zu diesem Zeitpunkt unterschied sich die Gefäßdichte in der Angiogenesezone in beiden Gruppen nicht vom Gefäßstatus in der Peripherie der Kammer. Auch zwischen den Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied.

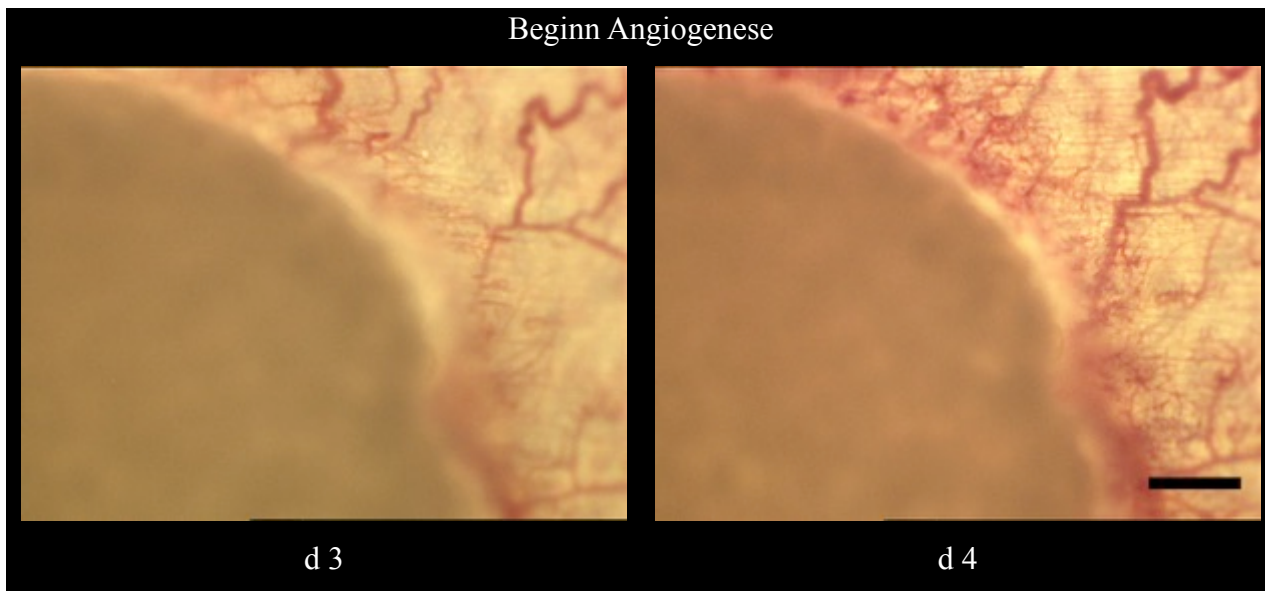


Abbildung 4-5 Angiogenese am Matrixrand, Vergrößerung 2,5x, Maßstab = 500  $\mu$ m

Erste erkennbare Gefäßaussprossungen wurden bei beiden Gruppen ab dem 4. Tag nach Implantation beobachtet (Abb. 4-5). Die höchste Gefäßdichte wurde an den Tagen 8 und 9 gemessen (Abb. 4-4) und betrug am Matrixrand 267 % bzw. 263 % des Ausgangswertes. Damit unterschied sie sich bei beiden Gruppen auch deutlich von der Entwicklung in der Peripherie (145 % bzw. 164 % des Ausgangswertes). Zwischen den beiden Gruppen konnte jedoch zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p > 0,05$ ). Zum letztmöglichen Messzeitpunkt an den Tagen 10 und 11 waren Messungen nur noch an zwei Mäusen pro Gruppe möglich. Bei diesen war die Gefäßdichte leicht rückläufig (siehe Tab. 2 und Abb. 4-6).

Tabelle 1 Übersicht Gefäßdichte

	Tag 0/1		Tag 8/9		Tag 10/11	
	Matrixrand	Restfläche	Matrixrand	Restfläche	Matrixrand	Restfläche
chondrogen	3,68 mm <sup>-1</sup>	3,81 mm <sup>-1</sup>	9,82 mm <sup>-1</sup>	5,52 mm <sup>-1</sup>	6,44 mm <sup>-1</sup>	5,03 mm <sup>-1</sup>
hypertroph	4,69 mm <sup>-1</sup>	4,17 mm <sup>-1</sup>	12,37 mm <sup>-1</sup>	6,83 mm <sup>-1</sup>	8,21 mm <sup>-1</sup>	4,86 mm <sup>-1</sup>

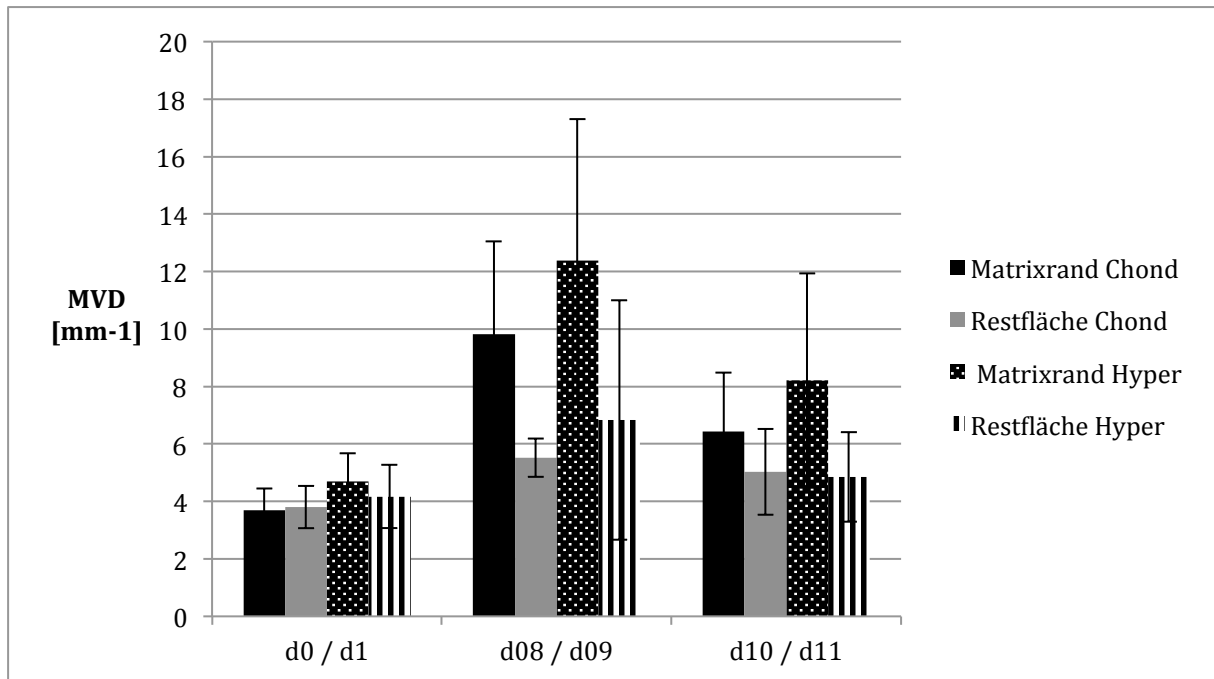


Abbildung 4-6 Übersicht Gefäßdichte

#### 4.3.1.2 Gefäßfunktionalität

Zur Beurteilung der Funktionalität neu entstandener Gefäße wurden am Tag 5 fluoreszenzmarkierte Erythrozyten injiziert und die Mäuse fortan zusätzlich auch unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Dabei konnte bei den den Matrixrand und die Matrixoberfläche tangierenden Gefäßen ein Durchfluss ab Tag 8 und somit deren Funktionalität nachgewiesen werden. In die Matrix einwachsende Gefäße konnten aufgrund der optischen Dichte der Matrix nicht beobachtet werden. Anstelle der Videoaufnahme, die den Erythrozytenfluss innerhalb der Gefäße dokumentiert, sind in Abb. 4-7 Ausschnitte unterschiedlicher Fokussierungsebenen dargestellt.

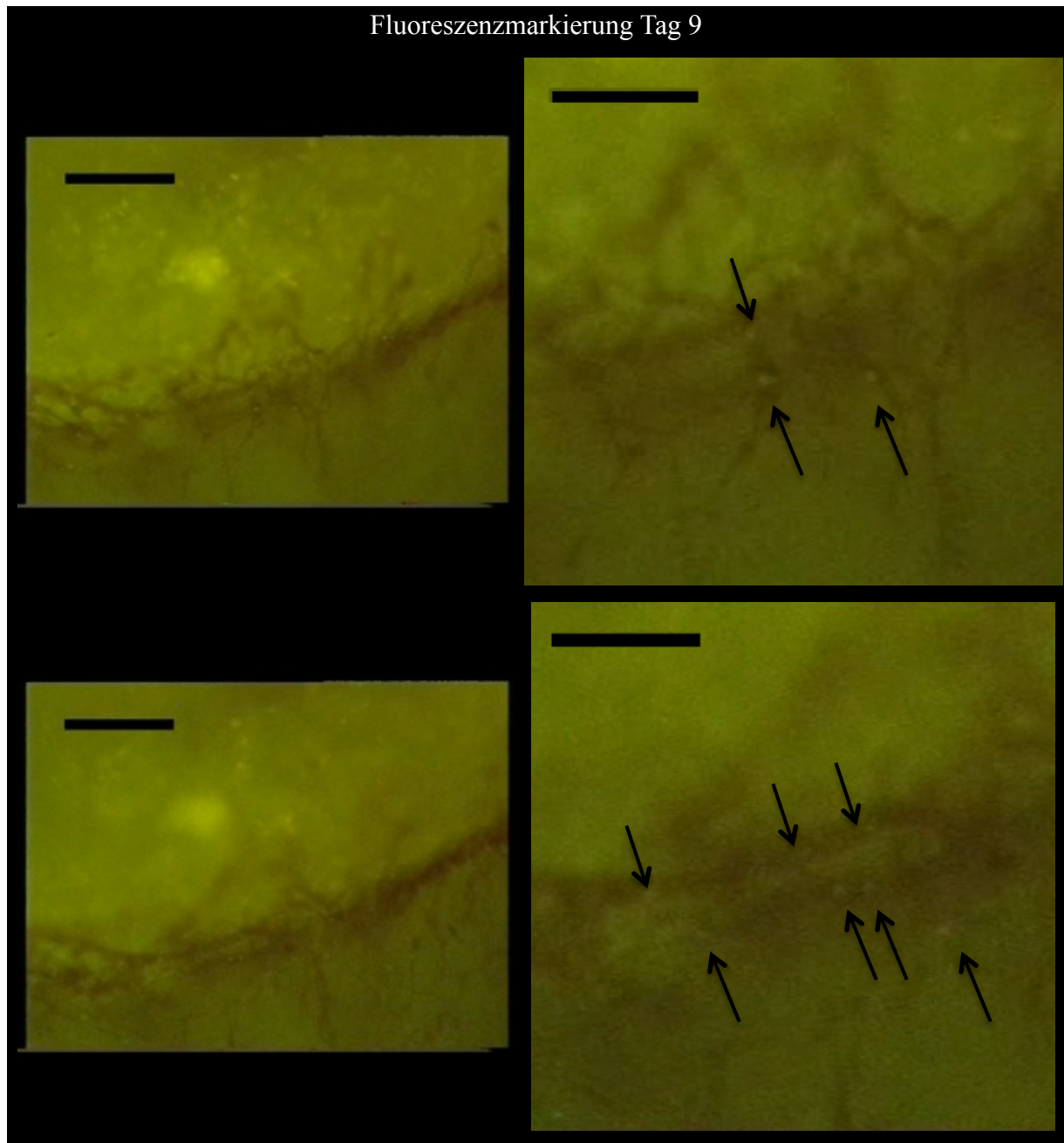


Abbildung 4-7 Snapshots der Videoaufnahme in sichtbarer Fluoreszenzmarkierung, Pfeile zeigen Erythrozyten, Vergrößerung 2,5x, Maßstab: 500  $\mu\text{m}$  (linke Spalte) 250  $\mu\text{m}$  (rechte Spalte)



#### 4.3.2 Immunhistochemie

Bei den dargestellten Schnitten handelt es sich um die Matrices mitsamt der Anhaftung des angrenzenden Hautareals der Maus, das zum Entnahmezeitpunkt aus der Rückenhautkammer ohne eine Beschädigung der Strukturen nicht mehr von der Matrix zu lösen war. Die Entnahme erfolgte zwischen dem 7. und dem 11. Tag nach Implantation. Zu den Färbungen von Kollagen X und CD31 wurden zusätzlich noch die Negativkontrollen zur besseren Abgrenzbarkeit der spezifisch angefärbten Strukturen angefügt. Matrices von Kammern, die besonders frühzeitig aus dem Versuch ausschieden, sind nicht aufgeführt. Bei Ihnen hatte die Matrix deutlich an Größe verloren und die Strukturen erschienen stark verdichtet.

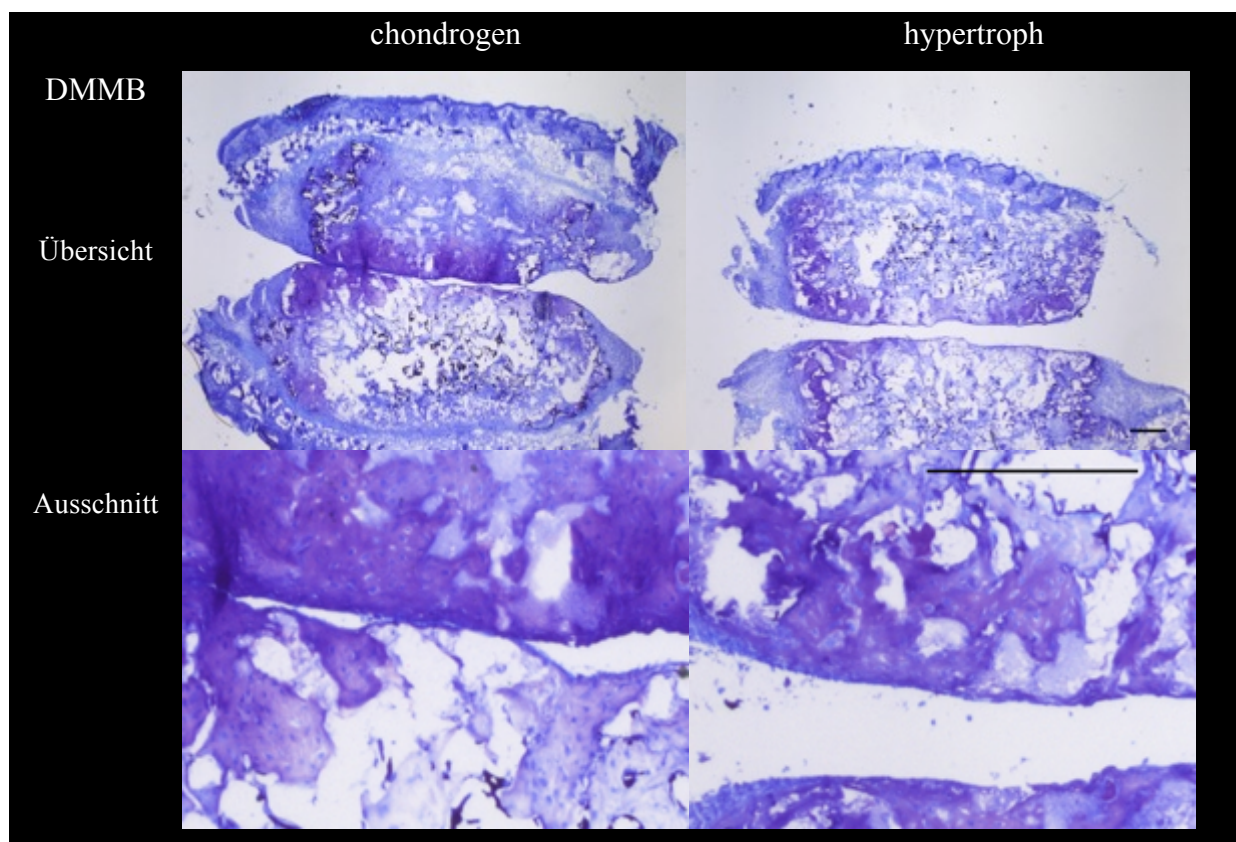


Abbildung 4-8 DMMB, Vergrößerung 2x, Maßstab = 500  $\mu$ m

In der DMMB-Färbung (Abb. 4-8) konnten in beiden Gruppen glykosaminoglykanreiche Areale dargestellt werden. Während diese in der chondrogen differenzierten Gruppe breitbasig an der hautfernen Matrixkante liegen, weist die hypertrophe Gruppe eine großflächigere Verteilung auf, auch erkennt man deutlich die lakunär imponierende Einbettung der hypertrophen Zellen in die Matrix. Unabhängig von der Beurteilung des Differenzierungsgrades kann festgestellt werden, dass die Matrices beider Gruppen vollständig mit Zellen besiedelt sind.

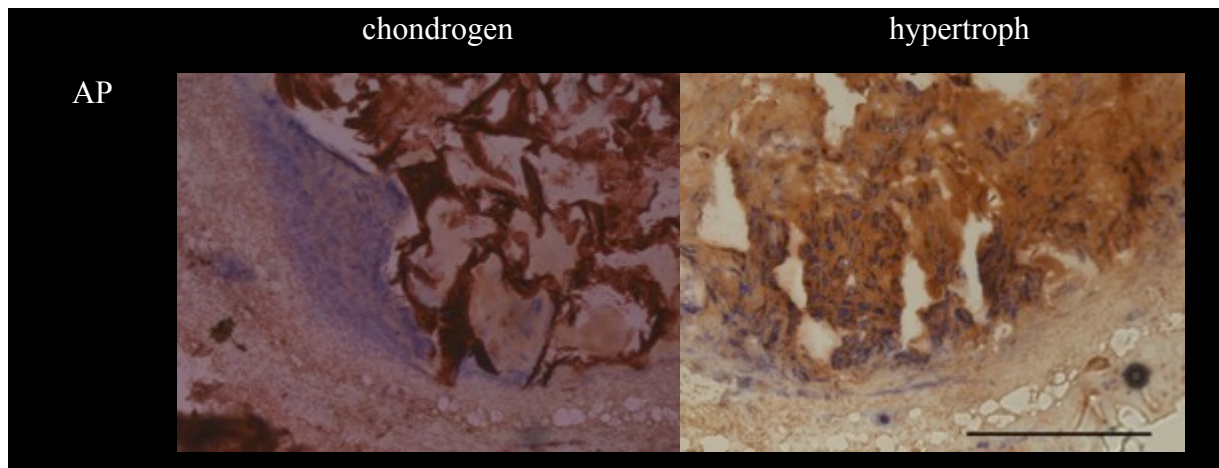
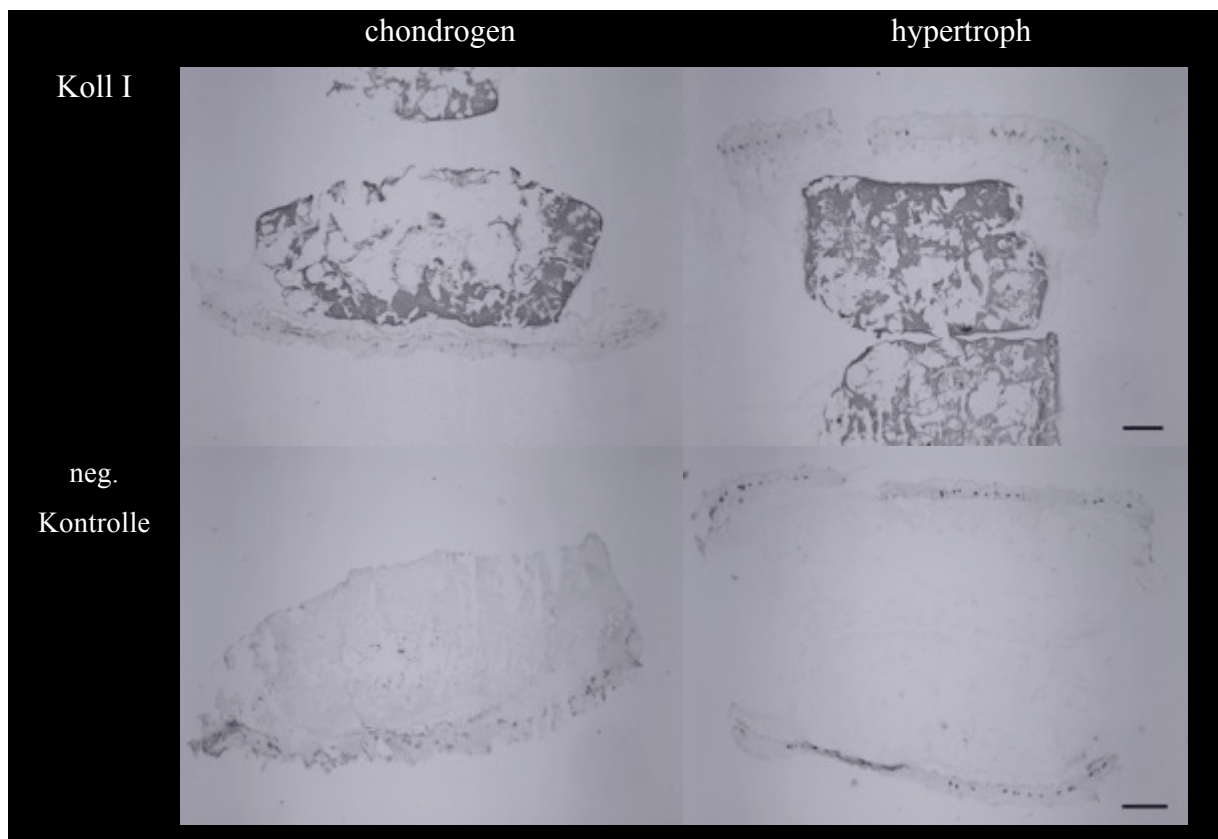


Abbildung 4-9 Alkalische Phosphatase, Vergrößerung 10x, Maßstab = 500 µm

Die alkalische Phosphatase (Abb.4-9) war in beiden Gruppen überwiegend nicht mehr nachweisbar. Es zeigte sich pro Matrix meist nur ein kleines randständiges Areal.

Eine homogene Verteilung wurde in beiden Gruppen für Kollagen I (Abb. 4-10) gezeigt. Eindeutlicher als vor der Implantation war die Hintergrundfärbung durch die Kollagen I-haltige Matrix.



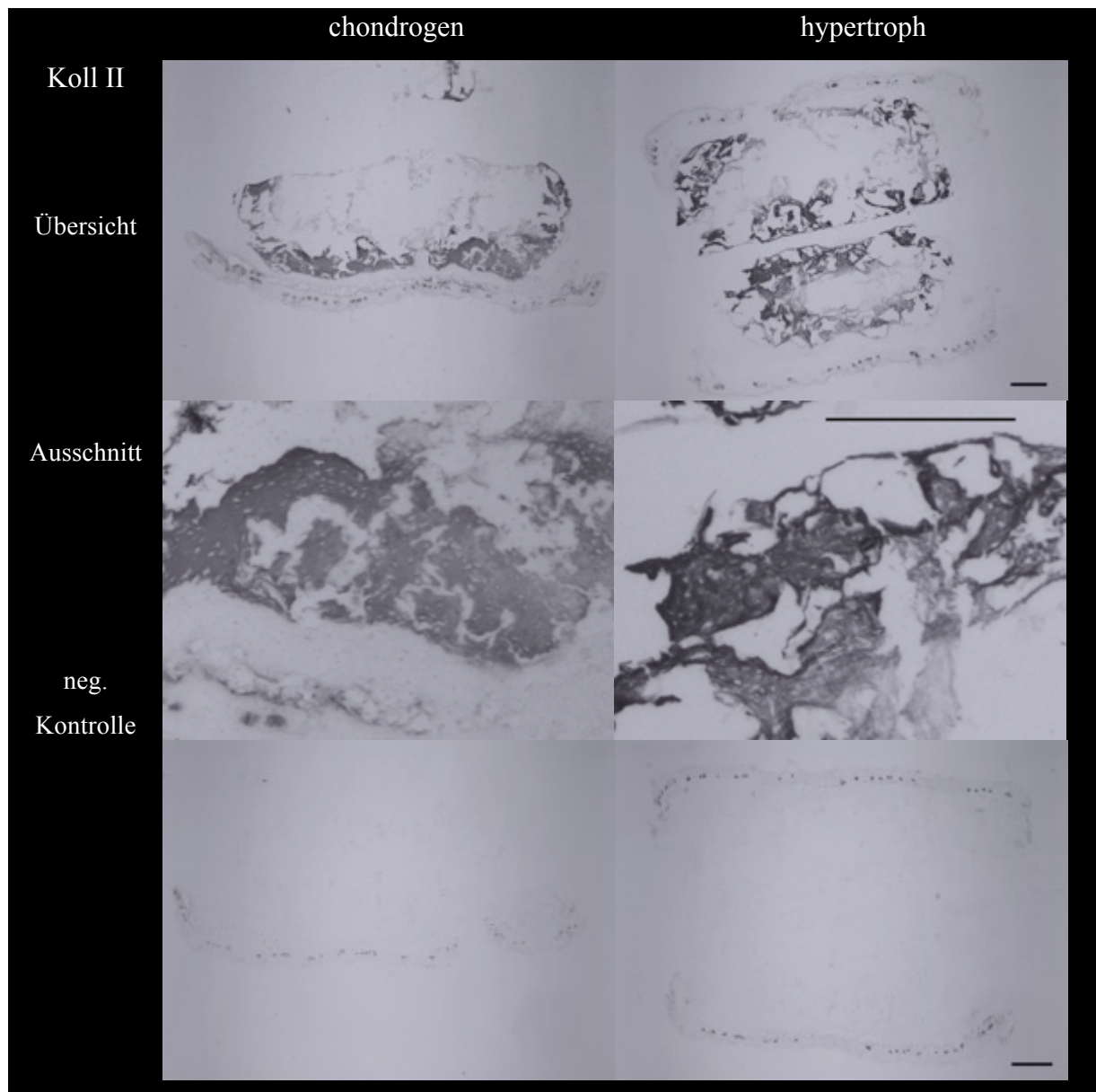


Abbildung 4-11 Kollagen II, Vergrößerung 2x, Maßstab = 500  $\mu\text{m}$

Demgegenüber ist die Verteilung von Kollagen II (Abb. 4-11) in beiden Gruppen ausschließlich auf die Randareale der Matrix beschränkt. Die Anfärbbarkeit imponiert bei der hypertrophen Gruppe etwas kräftiger.



Im Vergleich dazu ist Kollagen X (Abb. 4-12) deutlich reduziert darstellbar. Mehrheitlich bleibt die Anfärbbarkeit in der Hypertrophiegruppe auf kleine randständige Areale beschränkt. Vereinzelt zeigen sich jedoch breitere kontinuierliche Randareale positiv für Kollagen X. In der chondrogen differenzierten Gruppe zeigen sich nun auch vereinzelt randständige Areale anfärbbar, wenn auch insgesamt weniger als in der Hypertrophiegruppe.

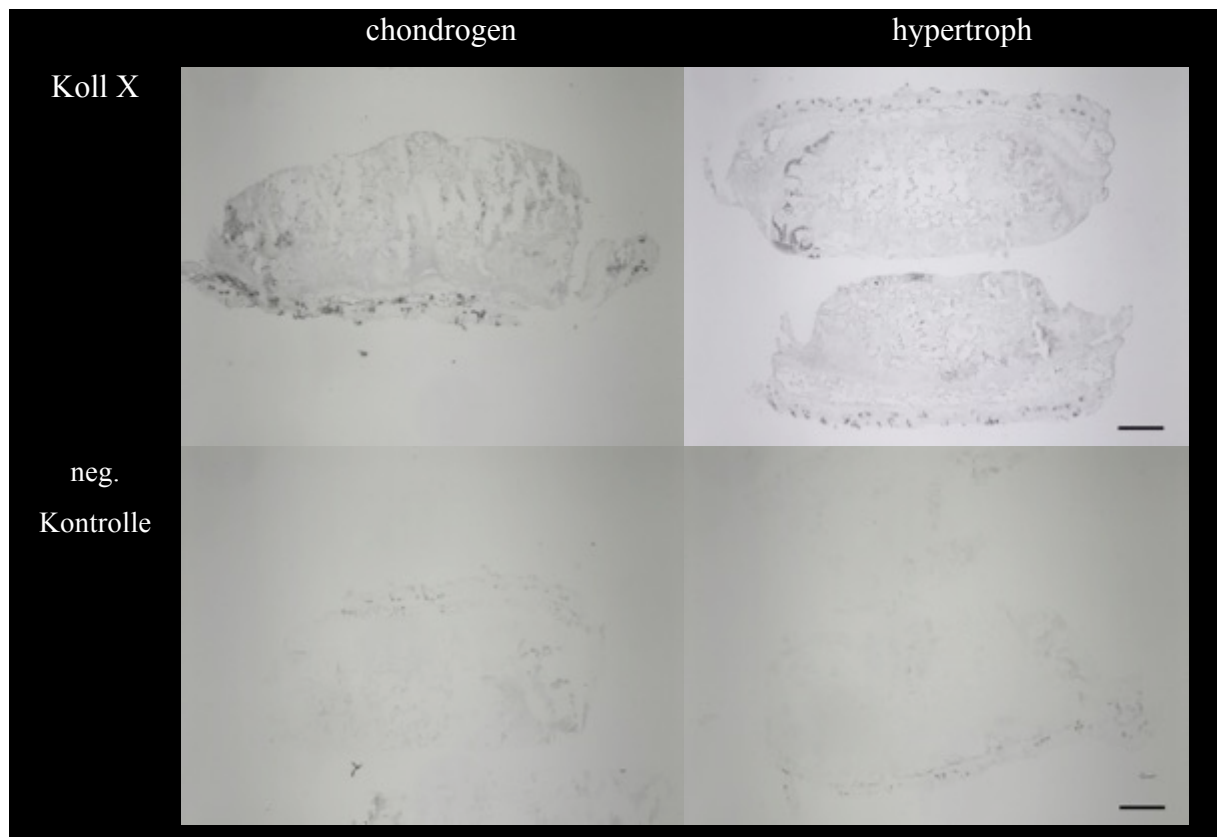


Abbildung 4-12 Kollagen X, 2x Vergrößerung, Maßstab = 500  $\mu$ m

Die Darstellung von Gefäßen mittels CD31 ist in beiden Gruppen deutlich positiv. Insgesamt war die Verteilung der Gefäßstrukturen nicht einheitlich. Die aufgeführten Schnitte zeigen in beiden Gruppen ein von der Maushaut ausgehendes Einwachsen der Gefäße in den zentralen Matrixteil. Dies führte bei den entsprechenden Tieren auch zu einer makroskopisch sichtbaren zentralen Abdunklung der Matrix. Zusätzlich ist in der hypertrophen Gruppe ein randständig betontes Wachstum erkennbar. Bei anderen im Folgenden nicht aufgeführten Versuchstieren war ein ausschließlich randständiges Gefäßwachstum zu beobachten.

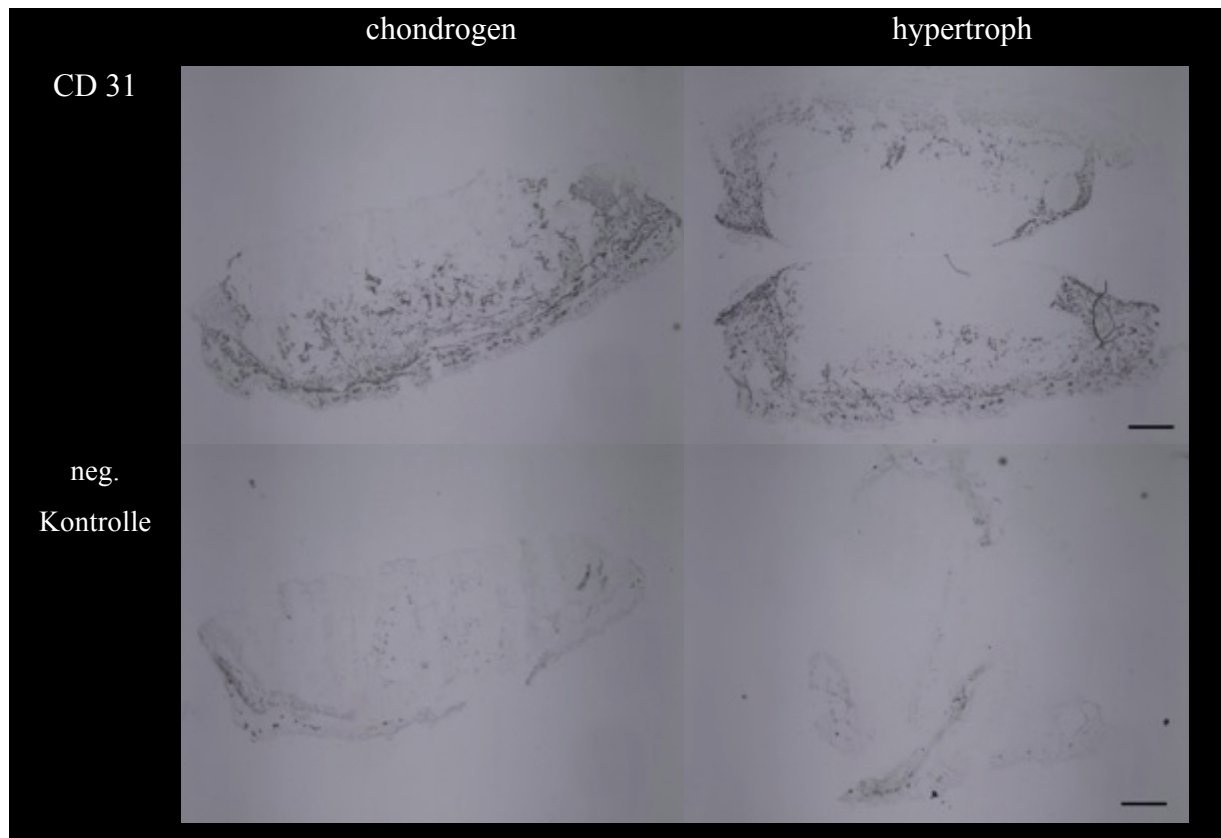


Abbildung 4-13 CD31, 2x Vergrößerung, Maßstab = 500µm

## **5 Diskussion**

### **5.1 Diskussion der Ergebnisse**

Pluripotente mesenchymale Stammzellen verfügen über ein hohes Potential, zukünftig die Grundlage geeigneter Tissue Engineering Produkte zu bilden, die bei Knorpel- und Knochen-substanzdefekten therapeutisch eingesetzt werden können. Einerseits kann inzwischen auf erprobte Methoden zur Entnahme und der in vitro Differenzierung zu reifen Chondrozyten zurückgegriffen werden. Auf der anderen Seite sind zahlreiche Faktoren sowie die Mechanismen ihres Zusammenwirkens im Hinblick auf die Chondrogenese in vivo, die Homöostase des Gelenkknorpels und dessen pathologische Destruktion bisher nicht ausreichend bekannt. Ein zentraler Aspekt dabei ist die Angiogenese.

Ein Zusammenhang zwischen der Angiogenese und der hypertrophen Differenzierung wurde bereits durch Pessese et.al. postuliert. Um diesen Zusammenhang in vivo ergründen zu können, wurden mesenchymale Stammzellen in Tissue Engineering Matrices über eine Dauer von 28 Tagen kultiviert, in der eine Differenzierung zu Chondrozyten erfolgte. Durch den Einsatz unterschiedlicher Medien ab Tag 14 erfolgte eine Aufteilung in je eine Gruppe mit beibehaltener chondrogener Differenzierung und eine mit darüber hinausgehender hypertropher Differenzierung. Dass vor dem Einsetzen in den lebenden Organismus in beiden Gruppen eine erfolgreiche Differenzierung in vitro stattgefunden hatte, konnte histologisch nachgewiesen werden. Eine glykosaminoglykanreiche Matrix sowie eine reduzierte Produktion von Kollagen I gegenüber Kollagen II wurde in beiden Gruppen festgestellt. In der Hypertrophiegruppe war darüber hinaus Kollagen X als eindeutiger Hypertrophiemarker nachweisbar. Auffällig war jedoch, dass die Anfärbung einer spezifischen Extrazellulärmatrix in allen Matrices auf den Matrixrand beschränkt war, mitunter auch nur auf eine der kreisrunden Oberflächen der Matrix und den gesamten daran angrenzenden Randbereich.

Primär muss davon ausgegangen werden, dass die zentralständige Beimpfung der Matrices mit wiederholten Pipettierbewegungen eine initial gleichmäßige Verteilung der Zellen in der gesamten Matrix gewährleistete. In der Matrix entstand durch die Beimpfung zwar ein Defekt, allerdings war dieser so gering, dass gestörte Zell-Zell und Zell-Matrix-Kontakte an dieser Stelle die ausbleibende Differenzierung der gesamten Matrixmitte nicht hinreichend erklären können. Wahrscheinlicher ist, dass die Penetration von Nährstoffen und Differenzierungsfaktoren in das Matrixinnere reduziert war. Insbesondere kann dies der Fall sein, wenn die Transportvorgänge in das Innere der Matrix durch eine fortschreitende Bildung von Extrazellulärmatrix im Randbereich erschwert wurden. Auch die Tatsache, dass eine der

beiden kreisrunden Matrixoberflächen kaum Differenzierungsmerkmale in der Histologie aufwies, könnte durch eine geringere Erreichbarkeit des Areals für Nährstoffe und Differenzierungsfaktoren erklärbar sein. Möglicherweise lag diese Seite längerfristig dem Boden der Zellkulturschale an. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in vorangegangenen Experimenten anderer Studien beschrieben. [90, 91]

Als weiterer Anhalt für eine hypertrophe Differenzierung gilt die Produktion von VEGF. Diese konnte für die Zellen während der Differenzierungsphase eindeutig belegt werden. Für den quantitativen Nachweis wurden die Überstände der 48h-Zellkulturmedien ab Beimpfen der Matrices einmal wöchentlich abgenommen und anschließend im ELISA analysiert. Dabei zeigte sich der höchste gemessene Wert 4 Tage nach Beimpfung der Matrices noch bevor ein hypertrophieinduzierendes Medium verwendet wurde. Im Verlauf sank der Wert zunächst ab, erreichte an Tag 20 seinen Tiefpunkt und stieg bis kurz vor der Implantation in die Maus in beiden Gruppen noch einmal an. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestand nicht. Der hohe Wert zu Beginn direkt nach der Matrixbeimpfung könnte mit dem Stress, den diese Prozedur auf die Zellen ausübt, in Zusammenhang stehen. Denkbar wäre einerseits, dass eine Reduktion der Zellzahl in Form eines einsetzenden Zellsterbens als Reaktion auf das stattgehabte Stressereignis zu einer im Verlauf geringeren Gesamtproduktion an VEGF geführt hat. Demzufolge wäre also lediglich die Anzahl der VEGF-Produzenten zu Beginn höher gewesen, nicht jedoch die VEGF-Produktion der einzelnen Zelle. Andererseits könnte auch eine veränderte Regulation der VEGF-Produktion auf zellulärer Ebene zu einem initialen Peak geführt haben. Zelzer et.al. haben gezeigt, dass VEGF für die Überlebensfähigkeit von Chondrozyten von besonderer Bedeutung ist. Weiterhin haben sie nachgewiesen, dass Chondrozyten in der Lage sind, die eigene Produktion als Reaktion auf ein Zellsterben massiv zu erhöhen, um so ihre Überlebensfähigkeit als Zellverband zu gewährleisten. [97] Das deutliche Absinken von VEGF in den Tagen nach dem Stressereignis, in denen die Zellen innerhalb der Matrix adhären werden und sich erfolgreich neu organisieren konnten, lässt sich daher ebenfalls in diesen Zusammenhang einordnen. Duan et.al. haben nachgewiesen, dass bereits der prä-hypertrophe Chondrozyt VEGF produziert und dass dessen Produktion mit zunehmender Hypertrophie zunimmt. [96, 98] Dies kann mit der Beobachtung in Einklang gebracht werden, dass VEGF mit Wechsel des Mediums an Tag 13 wieder zu steigen beginnt. Wenngleich die VEGF-Produktion in der Hypertrophiegruppe initial wieder stärker anzusteigen scheint, so ist doch an Tag 27 kein signifikanter Unterschied zur Chondrogenesegruppe vorhanden. Grundsätzlich ist bekannt, dass auch chondrogen differenzierte mesenchymale Stammzellen regelhaft Hypertrophiemarker exprimieren, wenngleich diese bei Hy-

pertrophen Zellen stärker ausgeprägt sein sollten. Möglicherweise wäre ein Unterschied bei einer prolongierten Kultivierungsdauer in einer Steigerung des angedeuteten Trends signifikant geworden. Der beobachtete Anstieg kann insgesamt als Hinweis darauf gewertet werden, dass an Tag 27 zwar bereits eine Hypertrophieinduktion stattgefunden hat, diese sich jedoch erst in einem Anfangsstadium befand und die VEGF-Produktion als Merkmal hypertropher Chondrozyten bis dahin in beiden Gruppen gleich ausgeprägt war.

Dahingegen war zum gleichen Zeitpunkt bereits Kollagen X in der Extrazellulärmatrix nachweisbar. Über die genaue zeitliche Abfolge der Ausprägung eindeutiger Marker der Chondrozytenhypertrophie finden sich in der aktuellen Literatur keine Aussagen. Gegebenenfalls erfolgt primär eine Umorganisation der Extrazellulärmatrix vom faserbildenden Kollagen II hin zum verstärkt netzartigen Kollagen X, [100] um dem in der Transformation begriffenen Gewebe Stabilität zu geben und die optimale Struktur für eine Gefäßinvasion [101] bereitzustellen. Erst dann, so könnte angenommen werden, wird ein Signal für die Invasion von Endothelzellen wie die VEGF-Produktion verstärkt.

Mit einer erfolgreichen Chondrocytendifferenzierung in Tissue-Engineering-Matrices war die notwendige Voraussetzung für den folgenden Versuchsteil in vivo erfüllt. Der Transfer in den lebenden Organismus wurde an Nacktmäusen durchgeführt, die zuvor zu Beobachtungszwecken eine Rückenhautkammer erhalten hatten. Nach Implantation der Matrices in die Kammern wurde das angiotaktische Verhalten der Chondrozyten mikroskopisch analysiert und im Anschluss durch eine Vermessung des gesammelten Bildmaterials die mikrovaskuläre Dichte ermittelt. Wenngleich es im Beobachtungszeitraum in beiden Gruppen zu einer deutlichen Zunahme der Gefäßdichte kam, so konnte doch zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Erste Gefäßeinsprossungen wurden bei beiden Gruppen ab dem 4. Tag nach Implantation beobachtet. Es folgte ein maximaler Anstieg der Gefäßdichte in der definierten Angiogenesezone an den Tagen 8 und 9, der 267 % (hypertroph) bzw. 263 % (chondrogen) des Ausgangswertes von Tag 1 betrug. Auch in der Kammerperipherie konnte ein leichter Anstieg der Gefäßdichte beobachtet werden, jedoch unterschied sich dieser signifikant von der in der Angiogenesezone. Demzufolge kann der Anstieg innerhalb der Angiogenesezone auf die Gegenwart des Tissue-Engineering-Konstrukts zurückgeführt werden und lässt somit einen Rückschluss auf dessen angiotaktisches Potential zu.

Um dieses zutreffend einschätzen zu können, müssen die verschiedenen angiogenen Einflussfaktoren gegeneinander abgewogen werden. Da hypertrophe Chondrozyten mit einer verstärkten Produktion von VEGF imponieren, [38, 52, 98, 102] ist davon auszugehen, dass de-

ren Gegenwart die Angiogenese fördert. Noch am Tag der Implantation haben die Zellen beider Gruppen nachweislich VEGF produziert und das in beinahe identischen Mengen. Auch zum Zeitpunkt der Implantation könnte zunächst die Auswirkung von Stress auf den inzwischen organisierten Zellverband und dessen VEGF-Produktion einen entscheidenden Einfluss gehabt haben. Durch den Transport in den Tier OP und den späteren Entzug von Nährmedium durch Implantation in die Rückenhautkammer wurde dieser auf beide Gruppen gleichermaßen ausgeübt. Ob die gleiche Noxe auch bei beiden Gruppen das gleiche Ausmaß einer reaktiven Freisetzung pro-angiogener Faktoren hatte, kann nur vermutet werden. Sicher ist, dass dieser Effekt einen signifikanten Unterschied im angiotaktischen Verhalten zumindest in der Anfangsphase des Beobachtungszeitraums deutlich hätte maskieren können.

Durch das initial eingebrachte Zellmaterial konnte während dieser Phase demzufolge eine signifikante Gefäßneubildung induziert werden, die keine eindeutigen Rückschlüsse auf einen Zusammenhang mit einer unterschiedlichen Zelldifferenzierung zulässt. Möglich ist daher, dass in dem verfügbaren Beobachtungszeitraum kein messbarer Unterschied zwischen chondrogenen und hypertrophen Chondrozyten hinsichtlich der Angiogenese bestand.

Um diese Aussage treffen zu können, muss jedoch diskutiert werden, ob der eingangs identifizierte Differenzierungsgrad nach Implantation in die Maus im gesamten Verlauf aufrecht erhalten wurde. Aufschluss darüber gibt die histologische Analyse des Gewebes nach Explantation. Hier zeigte sich mehrheitlich eine deutliche Reduktion des Kollagen X in der Hypertrophiegruppe. Von wenigen Ausnahmen abgesehen, waren nur noch vereinzelte randständige Areale positiv für Kollagen X. Kollagen II hingegen imponierte kräftig in einer breiten randbetonten Verteilung, wobei die Anfärbbarkeit in der Hypertrophiegruppe noch deutlicher war. Für beide Gruppen war der Nachweis von Kollagen II zum Zeitpunkt der Explantation höher als zum Zeitpunkt der Implantation. Ein Rückgang von Kollagen X und eine Zunahme von Kollagen II deuten auf einen Verlust der Hypertrophie der Zellen hin. Markway et.al. haben bei in vitro durchgeführten Versuchen an gesunden und von Arthrose betroffenen Gelenkknorpelzellen unter anderem die Veränderung der Matrixzusammensetzung unter Hypoxie untersucht. [103] Dabei wurde bei beiden Gruppen eine deutliche Zunahme an Kollagen II in der Extrazellulärmatrix beobachtet. In der Gruppe der von Arthrose betroffenen Zellen, die eine entsprechende Hypertrophie aufwiesen, wurde unter Hypoxie ein drastischer Rückgang an Kollagen X beobachtet. Duval et al. gelang es in einem Versuch, bei dem gänzlich auf den Einsatz chondroinduktiver Faktoren in der Zellkultur verzichtet wurde, durch die alleinige Hypoxie einen deutlichen chondrogenen Effekt auf mesenchymale Stammzellen nachzuweisen. [104] Darüber hinaus beobachteten sie die stabile Aufrechterhaltung einer chondrogenen

Differenzierung unter Hypoxie und sogar die Redifferenzierung zuvor dedifferenzierter Chondrozyten mit Ursprung aus dem Gelenkknorpel. [105] Gawlitta et. al. zeigten, dass hypoxische Kulturbedingungen mesenchymaler Stammzellen zumindest zu einer deutlich verzögerten Ausprägung von Hypertrophiemerkmalen führten, [106] während diese bei Sheehy et.al. unter Hypoxie gänzlich supprimiert blieben. [107] Derartige Reaktionen auf Hypoxie wurden in zahlreichen voneinander unabhängigen Studien publiziert. [108-112] Sie korrelieren mit den Ergebnissen der vorliegenden in vivo Untersuchung, weshalb auf eine Dedifferenzierung der hypertrophen Zellen unter einer anzunehmenden Hypoxie nach Implantation in die Kammer geschlossen werden kann. Über die präzise Dynamik dieser Entwicklung im Zeitraum zwischen der Matriximplantation und der Explantation kann jedoch nur gemutmaßt werden. Während Gelenkknorpel durch seine Avaskularität ohnehin einer erniedrigten Sauerstoffzufuhr unterliegt, [113] sind die in der Kammer vorherrschenden Sauerstoffpartialdrücke nicht bekannt. Eine Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen durch Diffusionsbewegungen der Synovia wie im Gelenk konnte nicht erfolgen. Das aufgelegte Deckglas dichtete die Kammer ab, sodass eine funktionierende Gefäßversorgung den einzigen effektiven Transportvorgang nach der erfolgten Implantation darstellte. Der Nachweis von Gefäßen gelang in der Intravitalmikroskopie und der Histologie durch den immunhistochemischen Nachweis von CD31. Dass die gebildeten Gefäße eine funktionelle Blutzirkulation ermöglichten, konnte fluoreszenzmikroskopisch ab Tag 8 belegt werden. Wie effektiv eine Sauerstoffzufuhr dadurch gewährleistet war, kann nicht festgestellt werden. Sicher ist jedoch, dass die Sauerstoffzufuhr über mindestens 7 Tage hinweg stark reduziert war und so Regulationsmechanismen für eine Dedifferenzierung aktiviert worden sein könnten.

Im Gegensatz zu der beobachteten Dedifferenzierung steht die Annahme von Pesesse et.al. bezüglich der wechselseitigen Beeinflussung von Angiogenese und Differenzierung. [38] Durch die erfolgte Gefäßneubildung hätte erwartet werden können, dass eine Verstärkung der hypertrophen Differenzierung eintritt. Hinsichtlich der hypertrophen Zellen überwogen im Versuch offenbar andere Einflussfaktoren. Das Modell kann jedoch herangezogen werden, um die beobachtete, wenngleich geringe Steigerung der Expression von Kollagen X in der chondrogenen Gruppe zu erklären. Barbarina et.al. konnten nachweisen, dass immigrierende Endothelzellen beim Vorgang der Angiogenese über die Beeinflussung von Proteinasen die Hypertrophie von Chondrocyten fördern. [54] So lässt sich die teilweise Expression von Kollagen X in der chondrogenen Gruppe als Hypertrophie in Reaktion auf eine stattgehabte Angiogenese interpretieren.

Eine Dedifferenzierung der hypertrophen Chondrozyten in Kombination mit einer beginnenden hypertrophen Differenzierung in der initial chondrogenen Gruppe sprechen also für eine schrittweise Egalisierung des Differenzierungsgrades während des in vivo Versuchsteils. Auch diese Tatsache wird zu dem nicht signifikanten Unterschied in der Entwicklung der Gefäßdichte beigetragen haben. Bei allen vergleichenden Betrachtungen zwischen chondrogenen und hypertrophen Zellen sollte jedoch stets bedacht werden, dass die natürliche Sequenz der enchondralen Ossifikation, in der die Hypertrophie von Chondrozyten als Vorstufe der Knochensubstanz auftritt, auch mit der Apoptose jener Zellen einhergeht. Die Reduktion messbarer Hypertrophiemarker wird durch diese Entwicklung begünstigt und darf nicht a priori als mangelnder Differenzierungserfolg oder als Differenzierungsverlust gewertet werden.

## **5.1 Diskussion der Methoden**

Als weiterer Einflussfaktor auf die ermittelte Gefäßdichte muss die Inflammation berücksichtigt werden. Es ist bekannt, dass inflammatorische Prozesse und Angiogenese häufig miteinander einhergehen, wie es auch bei der Arthrose der Fall ist. [45, 47-49, 55, 56] Einen entscheidenden Beitrag leisten Makrophagen, die zu einem Anstieg der VEGF-Konzentration beitragen. [49] Als Auslöser einer inflammatorischen Reaktion kann bei der Arbeit mit Rückenhautkammern eine mechanische Reizung in Kombination mit der erhöhten Vulnerabilität des Gewebes nach erfolgter mikrochirurgischer Präparation in Betracht gezogen werden. [87] Durch die hintere Aussparung der Rückenhautkammer hindurch bestand eine deutliche Ausstülpung der Haut, die durch das zylindrische Volumen der Matrix zwischen Deckglas und Haut hervorgerufen wurde. Das Gewebe, auf der die Matrix auflag stand dementsprechend unter Druckspannung, die umgebende Haut unter Zugspannung. In der Peripherie verursachte die Rückenhautkammer durch die Bewegung der Maus Reibung an der Haut. Zusätzlich zu der Bildung von Granulationsgewebe im Rahmen der Wundheilung gab es daher mehrere Prädispositionsstellen für das Auftreten von Inflammationsherden und eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Zirkulation entsprechender Mediatoren. Dies ist einer der Gründe, warum die Zeitspanne für Untersuchungen an der Rückenhautkammer begrenzt ist und unter Idealbedingungen selten mehr als 14 Tage beträgt. [87] Dennoch überraschte die hohe Ausscheiderrate von 65 % der Versuchstiere bis zum 8. Tag. Während die Mikroskopierbarkeit in Ermangelung einer einheitlich fokussierbaren Ebene von vornherein Einschränkungen unterlag, erfolgte das jeweilige Versuchsende aufgrund einer Trübung der Kammer, wodurch diese nicht mehr optisch durchdringbar war. Bei der Trübung konnte es sich in Abhängigkeit des Abbruchzeit-



punkts sowohl um ein druckassoziiertes Austreten von Flüssigkeit aus der Matrix in der Anfangsphase als auch um ein späteres inflammatorisch bedingtes Exsudat aufgrund der anhaltenden Gewebeerirritation handeln.

Um den Einfluss dieser Vorgänge auf die Angiogenese abschätzen zu können, wurde einerseits die Gefäßdichte des peripheren Kammerareals mit der eng gefassten Angiogenesezone direkt am Matrixrand verglichen. Tatsächlich waren beide Zonen deutlich voneinander unterscheidbar, was für eine nur geringe Beteiligung der Inflammation direkt am Matrixrand spricht.

Ferner kann das Verteilungsmuster des immunhistochemischen Nachweises von CD31 Aufschluss über die Beteiligung entzündlicher Prozesse an der Gefäßneubildung geben. Gefäßnachweise fanden sich innerhalb der definierten Angiogenesezone am Matrixrand und über diese hinaus in die Matrix eindringend in Überlappung mit den Arealen erfolgreicher Zelldifferenzierung. Besonders deutlich gelang die Darstellung an der mikroskopisch nicht einsehbaren Matrixseite, die der Maushaut breitbasig auflag. Anzunehmen ist, dass eine große Kontaktfläche optimale Kommunikationsmöglichkeiten bot, sodass VEGF als pro-angiogener Faktor in unmittelbarer Nähe zu den subcutanen Gefäßen der Maus wirksam werden konnte. Dies würde für den prägnanten Einfluss einer entsprechenden Zelldifferenzierung sprechen. Auffällig war jedoch, dass die Gefäße von dort ausgehend mitunter weit in das Matrixinnere hineinwuchsen, wo nachweislich keine chondrogene oder hypertrophe Zelldifferenzierung verortet werden konnte. Hinzu kommt, dass die Matrix in ihrer Grundstruktur Hyaluronsäure enthält, die an sich eine anti-angiogene Wirkung aufweist. [114-116] In der Matrixmitte musste also ein Ungleichgewicht aus pro- und anti-angiogenen Faktoren vorgelegen haben, das mit dem dargebotenen Ausmaß an beobachteter Angiogenese primär nicht vereinbar wäre. Als entscheidender Einflussfaktor kann hier die Inflammation gewirkt haben: Eine große Kontaktfläche bot nicht nur eine optimale Kommunikationsmöglichkeit, sondern führte auch zu einer verstärkten Irritation des Gewebes. Über bereits vorhandene Gefäßstrukturen am Matrixrand existierten Transportwege in das Matrixinnere hinein. Insbesondere die Vorläuferstrukturen eines stabilen Gefäßes sind porös und verstärkt permeabel für Mediatoren und Zellen des Immunsystems. Inflammatorische Prozesse werden so vereinfacht angeregt und aufrechterhalten. [50] Darüber hinaus ist bekannt, dass die Endothelzellfunktion durch Entzündungsreaktionen gestört wird, [117] sodass die gebildeten Gefäße instabil bleiben. Auch dieser Mechanismus wird in der Peripherie zu einem verstärkten Austritt von Flüssigkeit beigetragen und zu einer Kammertrübung geführt haben. Ebenfalls könnte das Material der Matrix selbst durch das inflammatorische Geschehen in seiner Struktur verstärkt verändert worden sein. In vielen

Matrices der vorzeitig ausgeschiedenen Versuchstiere zeigte sich ein starker Substanzverlust im Sinne einer Schrumpfung der Matrix, die über das Maß ihrer geplanten Degradierung hinausging. Slevin et. al. konnten zeigen, dass die Hyaluronsäure in ihrer nativen Form zwar klar anti-angiogen wirkt, deren Degradierungsprodukte jedoch zu einer starken Endothelzellaktivierung mit konsekutiver Gefäßformierung führen. [118] Dieser Effekt könnte insgesamt, aber speziell im Matrixinneren die Angiogenese angeregt haben.

Darüber hinaus bewirkt die fortgeschrittene Degradierung eine Auflockerung der Matrixstrukturen, die das Eindringen von Gefäßen in das Innere der Matrix ebenso begünstigt haben könnte, wie die Abwesenheit einer dichten, schwer permeablen Extrazellulärmatrix bedingt durch das Fehlen differenzierter Zellareale in der Matrixmitte.

Zusammengefasst hat sich durch den Einsatz von Rückenhautkammern in der Intravitalmikroskopie die Angiogenese quantitativ nachweisen lassen. Die Auswertung unterlag jedoch deutlichen Einschränkungen: Inflammation führte einerseits zu einem häufigen verfrühten Ausschneiden von Versuchstieren, andererseits beeinflusste sie wahrscheinlich in nicht unerheblichem Ausmaß die Gefäßneubildung. Zur Verbesserung der Ausgangsbedingungen würde sicherlich die Verwendung kleinerer, insbesondere flacherer Matrices beitragen. Gegebenenfalls müsste dazu jedoch die Methode der Beimpfung überdacht werden, da das Trauma des Kanüleneinstichs ansonsten in einem ungünstigen Verhältnis zur Gesamtgröße des Konstrukts stünde.

## **5.2 Zusammenfassung**

Es gelang, mesenchymale Stammzellen aus dem Punktat des Beckenkamms zu isolieren, diese in vitro zur Proliferation anzuregen und in Tissue Engineering Matrices zu Chondrozyten zu differenzieren. Merkmale einer chondrogenen und einer hypertrophen Differenzierung konnten histochemisch und immunhistochemisch in den beiden Gruppen dargestellt werden. Eine Produktion von VEGF wurde im Zellkulturmedium mittels ELISA nachgewiesen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zeigte sich hier jedoch nicht, weshalb von einer noch nicht vollständig ausgebildeten Hypertrophie zum Implantationszeitpunkt auszugehen ist.

Die Analyse des intravitalmikroskopisch gewonnenen Bildmaterials ergab in beiden Gruppen eine deutliche Zunahme der Gefäßdichte. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand nicht, somit konnte die Hypothese, dass hypertrophe Chondrozyten die Angiogenese verstärkt anregen, nicht bestätigt werden. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass

nach dem Einbringen der Zellen in den lebenden Organismus eine Dedifferenzierung der ursprünglich hypertrophen Zellen beobachtet wurde, die mit einer Hypoxie in Zusammenhang stehen könnte. Die initial chondrogenen Zellen zeigten hingegen nach der Explantation mitunter Merkmale einer Hypertrophie. Diese könnte als Reaktion auf eine bereits erfolgte Gefäßneubildung interpretiert werden.

Die Methode der Intravitalmikroskopie unter Verwendung von Rückenhautkammern erwies sich zur Beobachtung der Angiogenese an Tissue Engineering Matrices grundsätzlich als geeignet. Einschränkungen bestanden jedoch hinsichtlich der Fokussierbarkeit, da die Matrices durch ihre Höhe zu einer Ausstülpung der Haut führten und so keine einheitliche Ebene mehr bestand. Auch zeigte sich das Modell durch die Reizung des Gewebes anfällig für Inflammationen. Abgesehen von der Beeinflussung der Angiogenese an sich waren inflammatorische Prozesse vermutlich ursächlich für eine Eintrübung der Kammer, die aufgrund mangelnder Mikroskopierbarkeit zu einem verfrühten Ausscheiden von 65 % der Versuchstiere bis zum 8. Tag führte. Zukünftig könnte daher die Verwendung deutlich flacherer Matrices zu einem optimierten Einsatz der Rückenhautkammer beitragen.

In der Gesamtbeschau der Ergebnisse kommt zum Ausdruck, wie sehr Zelldifferenzierung, Angiogenese und Inflammation von einem Verhältnis permanenter wechselseitiger Beeinflussung geprägt sind. Die Integration des Tissue-Engineering-Konstrukts in vivo stellt eine hochvulnerable Phase dar, in der ein Verlust der Zelldifferenzierung droht. Die Neubildung von Gefäßen kann mit einer initialen Sicherstellung des Sauerstoff- und Nährstofftransports zum Erhalt des Differenzierungsgrades beitragen, der für den Einsatz des Konstrukts bei Knorpeldefekten unabdingbar ist. Gleichzeitig vermag der Prozess der Angiogenese jedoch auch aktiv eine hypertrophe Differenzierung von Chondrozyten zu induzieren, was ihre Anwendung bei Knochendefekten ermöglicht. Um diese Vorgänge zukünftig gezielt steuern zu können, bedarf es der weiteren Auseinandersetzung mit den zugrunde liegenden Regulationsmechanismen sowie ihrer Dynamik in vitro und in vivo.

## 6 Literatur

1. Hunziker, E.B., *Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects*. Osteoarthritis Cartilage, 2002. 10(6): p. 432-63.
2. Campbell, C., *The healing of cartilage defects* Clin Orthop. 64: p. 45-63.
3. Messner K, G.J.C.r., *A critical review*. Acta Orthop Scand, 1996. 67: p. 523–9.
4. Buckwalter JA, M.H., *Articular cartilage 2: Degeneration and osteoarthrosis, repair, regeneration, and transplantation*. J Bone Joint Surg, 1997. 97A: p. 612–32.
5. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. 260(5110): p. 920-6.
6. Angele, P., et al., *Characterization of esterified hyaluronan-gelatin polymer composites suitable for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells*. J Biomed Mater Res A, 2009. 91(2): p. 416-27.
7. Chen, F.H., K.T. Rousche, and R.S. Tuan, *Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006. 2(7): p. 373-82.
8. Ahsan T, L.L., Harwood F, Amiel D, Sah RL, *Integrative cartilage repair: Inhibition by beta- aminopropionitrile*. J Orthopaed Res 1999. 17: p. 850–7.
9. Butler DL, G.S., Guilak F, *Functional tissue engineering: the role of biomechanics*. J Biomech Eng, 2000. 122: p. 570–5.
10. Schumann, D., et al., *Mechanobiological conditioning of stem cells for cartilage tissue engineering*. Biomed Mater Eng, 2006. 16(4 Suppl): p. S37-52.
11. Alice J. Sophia Fox, A.B., and Scott A. Rodeo, *The Basic Science of Articular Cartilage Structure, Composition, and Function*. Sports Health, 2009. 1(6): p. 461–468.
12. DeLise, A.M., L. Fischer, and R.S. Tuan, *Cellular interactions and signaling in cartilage development*. Osteoarthritis Cartilage, 2000. 8(5): p. 309-34.
13. Lüllmann-Rauch, R., *Histologie Verstehen - Lernen - Nachschlagen*. Vol. 1. 2003, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
14. Ulfig, N., *Kurzlehrbuch Histologie*. Vol. 2. 2005, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
15. Dako, *FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human CD31 Endothelial Cell*.
16. Binette, F., et al., *Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro*. J Orthop Res, 1998. 16(2): p. 207-16.

17. Dreier, R., *Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders*. Arthritis Res Ther, 2010. 12(5): p. 216.
18. Burdan, F., et al., *Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate*. Folia Histochem Cytobiol, 2009. 47(1): p. 5-16.
19. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J. Orthop. Res., 1991. 9: p. 641–650.
20. Kevin C. Kemp, J.H., Dr Craig Donaldson *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Leukemia & Lymphoma,, 2005. 46: p. 1531-1544.
21. Nombela-Arrieta, C., J. Ritz, and L.E. Silberstein, *The elusive nature and function of mesenchymal stem cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. 12(2): p. 126-31.
22. Abdallah, B.M. and M. Kassem, *Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications*. Gene Ther, 2008. 15(2): p. 109-16.
23. Kosher, R.A., W.M. Kulyk, and S.W. Gay, *Collagen gene expression during limb cartilage differentiation*. J Cell Biol, 1986. 102(4): p. 1151-6.
24. Linsenmayer, T.F., B.P. Toole, and R.L. Trelstad, *Temporal and spatial transitions in collagen types during embryonic chick limb development*. Dev Biol, 1973. 35(2): p. 232-9.
25. Fuerst, M., et al., *Calcification of articular cartilage in human osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2009. 60(9): p. 2694-703.
26. Pelttari, K., E. Steck, and W. Richter, *The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis*. Injury, 2008. 39 Suppl 1: p. S58-65.
27. Caplan AI, B.B., in *Hall BK, Ed. Bone*. 1994. p. 1–46.
28. Adams CS, S.I., *The fate of the terminally differentiated chondrocyte: evidence for microenvironmental regulation of chondrocyte apoptosis*. Crit Rev Oral Biol Med, 2002. 13: p. 465–473.
29. Kronenberg, H.M., *Developmental regulation of the growth plate*. Nature, 2003. 423(6937): p. 332-6.
30. Goldring Mary B, M.K.B., *Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases* Arthritis Research & Therapy, 2009. 11 (3).
31. L, S., *Osteoarthritis: a review*. Clin Cornerstone, 1999. 2: p.:26–37.
32. MB, G., *The role of the chondrocyte in osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2000. 43: p. 1916–26.
33. N. Arden, M.C.N., *Osteoarthritis: epidemiology*. Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 2006. 20: p. 3–25.

34. Goldring, M.B., K. Tsuchimochi, and K. Ijiri, *The control of chondrogenesis*. J Cell Biochem, 2006. 97(1): p. 33-44.
35. Shimizu, H., S. Yokoyama, H. Asahara *Growth and differentiation of the developing limb bud from the perspective of chondrogenesis*. Dev Growth Differ, 2007. 49: p. 449-454.
36. Mueller, M.B., Tuan, R.S., *Anabolic/Catabolic Balance in Pathogenesis of Osteoarthritis: Identifying Molecular Targets*. A Framework for Rehabilitation Focused Biologics, 2011. 3: p. 3-11.
37. Cawston TE, W.A., *Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2006. 20: p. 983-1002.
38. Pesesse, L., et al., *Consequences of chondrocyte hypertrophy on osteoarthritic cartilage: potential effect on angiogenesis*. Osteoarthritis Cartilage, 2013. 21(12): p. 1913-23.
39. Nalbant S, M.J., Kitumnuaypong T, Clayburne G, Sieck M, Schumacher HR Jr. , *Synovial fluid features and their relations to osteoarthritis severity: new findings from sequential studies*. Osteoarthritis Cartilage, 2003. 11: p. 50-4.
40. Moses MA, S.J., Langer R, *Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage*. Science, 1990. 248: p. 1408-10.
41. Pufe T, P.W., Tillmann B, Mentlein R, *The splice variants VEGF121 and VEGF189 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor are expressed in osteoarthritic cartilage*. Arthritis Rheum, 2001. 44: p. 1082-8.
42. Tada, K., Fukunaga, T., Wakabayashi, Y. et al., *Inhibition of tubular morphogenesis in human microvascular endothelial cells by co-culture with chondrocytes and involvement of trans-forming growth factor-b: a model for avascularity in human cartilage*. Biochim. Biophys. Acta 1994. 1201: p. 135 142.
43. Descalzi Cancedda, F., A. Melchiori,, *Production of angiogenesis inhibitors and stimulators is modulated by cultured growth plate chondrocytes during in vitro differentiation: dependence on extracellular matrix assembly*. Eur J Cell Biol, 1995. 66(1): p. 60-8.
44. Carmeliet, P., and Jain, R. K. , *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature (Lond.), 2000. 407: p. 249-257.
45. Walsh DA, H.L., *Angiogenesis: a therapeutic target in arthritis*. Curr Opin Investig Drugs, 2001. 2: p. 1054-63.

46. Liekens S, D.C.E., Neyts J, *Angiogenesis: regulators and clinical applications*. Biochem Pharmacol, 2001. 61: p. 253–70.
47. Walsh DA, B.C., Turner EL, Wilson D, Situ M, McWilliams DF, *Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2007. 15(743e51).
48. Walsh DA, B.C., Turner EL, Wilson D, Situ M, McWilliams DF, *Angiogenesis and arthritis*. Rheumatology (Oxford), 1999. 38: p. 103–12.
49. Sunderkotter C, G.M., Schulze-Osthoff K, Bhardwaj R, Sorg C, *Macrophage-derived angiogenesis factors*. Pharmacol Ther 1991. 51: p. 195–216.
50. Koch AE, B.J., Haines GK, Carlos TM, Harlan JM, Leibovich SJ, *Immunolocalization of endothelial and leukocyte adhesion molecules in human rheumatoid and osteoarthritic synovial tissues*. Lab Invest 1991. 64: p. 313–20.
51. Sledge CB, R.A., Walsh DA, Blake DR, *Biology of the normal joint*, in Kelley's *Textbook of Rheumatology*, H.E. Ruddy S, Sledge CB, Editor. 2001, W. B. Saunders: Philadelphia:. p. 1–26.
52. Ferrara, N. and H.P. Gerber, *The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis*. Acta Haematol, 2001. 106(4): p. 148-56.
53. Bonnet, C.S. and D.A. Walsh, *Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation*. Rheumatology (Oxford), 2005. 44(1): p. 7-16.
54. Babarina AV, M.U., Bittner K, Vischer P, Bruckner P, *Role of the subchondral vascular system in endochondral ossification: endothelial cell-derived proteinases derepress late cartilage differentiation in vitro*. Matrix Biol, 2001. 20: p. 205–13.
55. Suri, S., et al., *Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis*. Ann Rheum Dis, 2007. 66(11): p. 1423-8.
56. Walsh, D.A., et al., *Angiogenesis and nerve growth factor at the osteochondral junction in rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. Rheumatology (Oxford), 2010. 49(10): p. 1852-61.
57. Ok Hee Jeon, J.E., *Orthopedic tissue regeneration: cells, scaffolds, and small molecules*. Drug Deliv. and Transl. Res., 2015. epub ahead of print.
58. Langer F, G.A., West M, Urovitz E, *The immunogenicity of allograft knee joint transplants*. Clin Orthop, 1978. 132: p. 155–62.
59. S, S., *The immune response to osteochondral allografts in dogs*. J Bone Joint Surg, 1987. 69A: p. 573–82.

60. Diduch DR, J.L., Mierisch CM, Balian G, *Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects*. Arthroscopy, 2000. 16: p. 571–577.
61. Daher, R.J., et al., *New methods to diagnose and treat cartilage degeneration*. Nat Rev Rheumatol, 2009. 5(11): p. 599-607.
62. Noth, U., A.F. Steinert, and R.S. Tuan, *Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2008. 4(7): p. 371-80.
63. Mueller, M.B. and R.S. Tuan, *Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells*. Arthritis Rheum, 2008. 58(5): p. 1377-88.
64. Johnstone, B., et al., *In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells*. Exp Cell Res, 1998. 238(1): p. 265-72.
65. Mueller, M.B., et al., *Insulin is essential for in vitro chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells and influences chondrogenesis in a dose-dependent manner*. Int Orthop, 2013. 37(1): p. 153-8.
66. Mueller, M.B., et al., *Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis: effect of TGF-beta isoforms and chondrogenic conditioning*. Cells Tissues Organs, 2010. 192(3): p. 158-66.
67. Mueller, M.B., et al., *Effect of parathyroid hormone-related protein in an in vitro hypertrophy model for mesenchymal stem cell chondrogenesis*. Int Orthop, 2013. 37(5): p. 945-51.
68. Mackay, A.M., et al., *Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow*. Tissue Eng, 1998. 4(4): p. 415-28.
69. Mello MA, T.R., *Effects of TGF-1 and triiodothyronine on cartilage maturation: in vitro analysis using long-term high-density micromass cultures of chick embryonic limb mesenchymal cells*. J Orthop Res, 2006. 24: p. 2095–105.
70. McCarthy JB, V.B., Iida J, *Cell adhesion to collagenous matrices*. Biopolymers, 1996. 40: p. 371–81.
71. al, C.F.e., *Technology insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006. 2: p. 373–382.
72. al., R.J.e., *Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage*. Biotechnol Appl Biochem, 2007. 46: p. 73–84.
73. Risbud, M., J. Ringe, et al. , *In vitro expression of cartilage-specific markers by chondrocytes on a biocompatible hydrogel: implications for engineering cartilage tissue*. Cell Transplant 2001. 10(8): p. 755-63.



74. Angele, P., et al., *Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatin composite sponge*. Tissue Eng, 1999. 5(6): p. 545-54.
75. al., M.J.e., *Variations in matrix composition and GAG fine structure among scaffolds for cartilage tissue engineering*. Osteoarthritis Cartilage, 2005. 13: p. 828–836.
76. Radice, M.e.a., *Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors*. J Biomed Mater Res, 2000. 50(2): p. p.101- 9.
77. Pelttari, K., et al., *Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice*. Arthritis Rheum, 2006. 54(10): p. 3254-66.
78. Dickhut, A., et al., *Calcification or dedifferentiation: requirement to lock mesenchymal stem cells in a desired differentiation stage*. J Cell Physiol, 2009. 219(1): p. 219-26.
79. Thompson Emmet M., M.A., Kelly Daniel J., Gleeson John P., and O'Brien Fergal J, *An Endochondral Ossification-Based Approach to Bone Repair: Chondrogenically Primed Mesenchymal Stem Cell-Laden Scaffolds Support Greater Repair of Critical-Sized Cranial Defects Than Osteogenically Stimulated Constructs In Vivo*. Tissue Engineering Part A, March 2016. 22(5-6): p. 556-567.
80. Menger MD, L.M., Vollmar B *Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber*. Eur Surg Res 2002. 34: p. 83–91.
81. Guba, M., et al., *A primary tumor promotes dormancy of solitary tumor cells before inhibiting angiogenesis*. Cancer Res., 2001. 61(14): p. 5575-9.
82. JD, S., *The transparent chamber of the rabbit's ear giving a complete description of improved techniques of construction and introduction and general account of growth and behavior of living cells and tissues seen with the microscope*. Am J Anat 1928. 41: p. 447–472.
83. GH, A., *An adaptation of the transparent chamber technique to the mouse*. J Natl Cancer Inst 1943. 4: p. 1–11.
84. Funk W, E.B., Messmer K *A novel method for follow-up studies of the microcirculation in non-malignant tissue implants*. Res Exp Med (Berl), 1986 186: p. 259–270.

85. Leunig M, Y.F., Berk DA, Gerweck LE, Jain RK, *Angiogenesis and growth of isografted bone: quantitative in vivo assay in nude mice*. Lab Invest 1994. 71: p. 300–307.
86. Schumann, D., Breitenbuch, P., Angele, P., Kujat, R., Steinbauer, M., Nerlich, M. , *Intravitalmicroscopy for the Online-Monitoring of angiogenesis in Tissue Engineering Products for repair of osteochondral defects*  
Eur J Trauma 2002. 28: p. 28-29.
87. Koehl, G.E., A. Gaumann, and E.K. Geissler, *Intravital microscopy of tumor angiogenesis and regression in the dorsal skin fold chamber: mechanistic insights and preclinical testing of therapeutic strategies*. Clin Exp Metastasis, 2009. 26(4): p. 329-44.
88. M, M., *Intravital imaging and cell invasion*. Methods Enzymol 2007. 426: p. 375–401.
89. Szczesny G, V.A., Massberg S, Nolte D, Messmer K *Long-term anaesthesia using inhalatory isoflurane in different strains of mice-the haemodynamic effects*. Lab Anim, 2004. 38: p. 64–69.
90. D., S., *Methoden zur Optimierung von Tissue Engineering Produkten auf dem Wege zur Reparatur von osteochondralen Defekten*, in Universität Regensburg. 2004.
91. Teegen, E., *Hypertrophie chondrogen differenzierender mesenchymaler Stammzellen im dreidimensionalen System*, in Fakultät für Medizin Abteilung für Unfallchirurgie. 2012, Universität Regensburg: Regensburg.
92. Peattie, R.A., et al., *Stimulation of in vivo angiogenesis by cytokine-loaded hyaluronic acid hydrogel implants*. Biomaterials, 2004. 25(14): p. 2789-98.
93. Brand GMBH + CO KG, G., *Auswertungsformel Zählkammern*.
94. Nicholson SA, M.M., DeYoung BR, Swanson PE, *CD31 immunoreactivity in small round cell tumors*. . Appl Immunohistochem Mol Morphol 2000; . 8: p. 19-24.
95. Parums DV, C.J., Micklem K, Heryet AR, Gatter KC, Mason DY. , *JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections*. . J Clin Pathol 1990;. 43: p. 752-7.
96. Duan X, M.Y., Liu Y, Nicolae C, Olsen BR, Berendsen AD, *Vegfa regulates perichondrial vascularity and osteoblast differentiation in bone development*. Development. 142(11): p. 1984-91.

97. Elazar Zelzer, R.M., Napoleone Ferrara, Randall S. Johnson, Ernestina Schipani and Bjorn R. Olsen, *VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development*. Development, 2004. 131(9): p. 2161-71.
98. Petersen W, T.M., Pufe T, *Expression of VEGF121 and VEGF165 in hypertrophic chondrocytes of the human growth plate and epiphyseal cartilage*. J Anat, 2002. 201(2): p. 153-7
99. Turpaev K , L.D., Dubovaya V, Panasyuk A, Ivanov D, Prassolov V, *Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in cultured human articular chondrocytes*. Biochimie, 2001. 83(6): p. 515-22.
100. Eyre, D., *Articular cartilage and changes in Arthritis: Collagen of articular cartilage*. Arthritis Res Ther, 2002. 4: p. 30-35
101. Olena Jacenko, D.C., Amy Franklin, Susumu Ito, Charles B. Underhill, John F. Bateman, Michelle R. Campbell, *A Dominant Interference Collagen X Mutation Disrupts Hypertrophic Chondrocyte Pericellular Matrix and Glycosaminoglycan and Proteoglycan Distribution in Transgenic Mice*. AM J Pathol., 2001. 159: p. 2257-2269.
102. Levenberg, S., *Engineering blood vessels from stem cells: recent advances and applications*. Curr Opin Biotechnol, 2005. 16(5): p. 516-23.
103. Markway BD, C.H., Johnstone B, *Hypoxia promotes redifferentiation and suppresses markers of hypertrophy and degeneration in both healthy and osteoarthritic chondrocytes*. Arthritis Res Ther. , 2013 5(4) p. R92.
104. Duval, E., et al., *Molecular mechanism of hypoxia-induced chondrogenesis and its application in in vivo cartilage tissue engineering*. Biomaterials, 2012. 33(26): p. 6042-51.
105. Duval, E., et al., *Hypoxia-inducible factor 1alpha inhibits the fibroblast-like markers type I and type III collagen during hypoxia-induced chondrocyte redifferentiation: hypoxia not only induces type II collagen and aggrecan, but it also inhibits type I and type III collagen in the hypoxia-inducible factor 1alpha-dependent redifferentiation of chondrocytes*. Arthritis Rheum, 2009. 60(10): p. 3038-48.
106. Gawlitta D, v.R.M., Schrijver EJ, Alblas J, Dhert WJ, *Hypoxia impedes hypertrophic chondrogenesis of human multipotent stromal cells*. Tissue Eng Part A, 2012. 18: p. 19-20.

107. Sheehy, E.J., C.T. Buckley, and D.J. Kelly, *Oxygen tension regulates the osteogenic, chondrogenic and endochondral phenotype of bone marrow derived mesenchymal stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. 417(1): p. 305-10.
108. Betul Kul Babur, P.G., Peter Levett, William B. Lott, Travis Klein, Justin J. Cooper-White, Ross Crawford, and Michael R. Doran, *The Interplay between Chondrocyte Redifferentiation Pellet Size and Oxygen Concentration*. PLoS One, 2013. 8.
109. Ollitrault D, L.F., Drougard C, Briand M, Benateau H, Goux D, Chajra H, Poulain L, Hartmann D, Vivien D, Shridhar V, Baldi A, Mallein-Gerin F, Boumediene K, Demoor M, Galera P., *BMP-2, hypoxia, and COL1A1/HtrA1 siRNAs favor neo-cartilage hyaline matrix formation in chondrocytes*. Tissue Eng Part C Methods. , 2015. 21(2):: p. 133-47.
110. Hirao, M., et al., *Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification*. J Biol Chem, 2006. 281(41): p. 31079-92.
111. Zhu, M., Q. Feng, and L. Bian, *Differential effect of hypoxia on human mesenchymal stem cell chondrogenesis and hypertrophy in hyaluronic acid hydrogels*. Acta Biomater, 2014. 10(3): p. 1333-40.
112. Meretoja, V.V., et al., *The effect of hypoxia on the chondrogenic differentiation of co-cultured articular chondrocytes and mesenchymal stem cells in scaffolds*. Biomaterials, 2013. 34(17): p. 4266-73.
113. Adam O'Reilly, D.J.K., *Role of Oxygen as a Regulator of Stem Cell Fate During the Spontaneous Repair of Osteochondral Defects*. Journal of Orthopaedic Research, 2015. Epub ahead of print.
114. West, D.C., Fan, T.-P.D., *Hyaluronan as a regulator of angiogenesis in wound healing*, in *The New Angiotherapy*. , T.-P.D. Fan, Kohn, E.C. , Editor. 2002 Humana Press. p. 177–188.
115. Feinberg RN, B.D., *Hyaluronate in vasculogenesis*. Science, 1983. 10;220: p. 1177-9.
116. Ueda K, A.J., Ogasawara S, Todoroki K, Nakayama M, Sumi A, Kusano H, Sanada S, Suekane S, Xu K, Bae KH, Kurisawa M, Igawa T, Yano H, *Growth inhibitory effect of an injectable hyaluronic acid-tyramine hydrogels incorporating human natural interferon- $\alpha$  and sorafenib on renal cell carcinoma cells*. Acta Biomater, 2016 (Epub 2015).
117. Vion AC, R.P., Durand F, Boulanger CM, Valla DC., *Interplay of Inflammation and Endothelial Dysfunction in Bone Marrow Transplantation: Focus on Hepatic Venous Occlusive Disease*. Semin Thromb Hemost, 2015 41(6): p. 629-43.

118. Slevin M, K.J., Gaffney J, Matou S, West D, Delisser H, Savani RC, Kumar S, *Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways*. Matrix Biol, 2007. 26(1): p. 58-68.

## **7      Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1-1 Aufbau Gelenkknorpel	5
Abbildung 1-2 Matrix rasterelektronenmikroskopisch	12
Abbildung 3-1 Schema Versuchsaufbau	25
Abbildung 3-2 Ansicht Rückenhautkammer	31
Abbildung 3-3 Schema zur Vermessung der Gefäßdichte,	32
Abbildung 4-1 Übersicht Immunhistochemie am Ende der Differenzierungsphase	51
Abbildung 4-2 VEGF-Konzentration im Medium	43
Abbildung 4-3 Rückenhautkammer und Matriximplantation	44
Abbildung 4-4 Übersicht Intravitalmikroskopie d1 bis d11	45
Abbildung 4-5 Angiogenese am Matrixrand	46
Abbildung 4-6 Übersicht Gefäßdichte	47
Abbildung 4-7 Snapshots der Videoaufnahme in sichtbarer Fluoreszenzmarkierung	48
Abbildung 4-8 DMMB	49
Abbildung 4-9 Alkalische Phosphatase	50
Abbildung 4-10 Kollagen I	51
Abbildung 4-11 Kollagen II	51
Abbildung 4-12 Kollagen X	52
Abbildung 4-13 CD31	53

## 8 Danksagung

Herrn Professor Nerlich und Herrn Professor Angele danke ich für die Überlassung des Themas, die großzügige Ausstattung meines Projekts und die Gelegenheit zur regelmäßigen Teilnahme an den Forschungswochenenden.

Herrn PD Dr. Michael Müller danke ich für die konstruktive und engagierte Betreuung meiner Arbeit sowie dafür, dass ich die Möglichkeit hatte, mir bei der Bearbeitung der Fragestellung eine wertvolle Methodenvielfalt erschließen zu können.

Insbesondere danke ich Frau Dr. Gudrun Köhl für ihre präzise Anleitung in der Arbeit mit Rückenhautkammern und dafür, dass sie mir mit ihrer Expertise in der Intravitalmikroskopie als stete Ansprechpartnerin zur Verfügung stand.

Herrn Dr. Richard „Q“ Kujat danke ich für die Möglichkeit, seine Matrixentwicklung nutzen zu dürfen sowie für seine technische Unterstützung bei deren Herstellung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Daniela Drenkard, die mich nicht nur mit großem Sachverstand in die Routine der Laborarbeit eingewiesen hat, sondern auch meine gesamte Zeit im Labor als motivierender „guter Geist“ begleitet hat.

Meiner Familie danke ich für ihre bedingungslose Unterstützung und ihre stete Geduld.

Meiner Schwester Anna-Louisa danke ich für ihr wachsames Auge (occhio!).

M. Ib. Lbb. Dr. Christian A. Keller danke ich dafür, dass er mir in weiser Mäeutik beigebracht hat, wie man allem Zweifel zum Trotz einen Elefanten verspeist – ex est!

## **9 Curriculum vitae**

Aus Datenschutzgründen wurde in der elektronischen Publikation auf die Darstellung des Lebenslaufs verzichtet.

## **10 Erklärung**

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von 2009 bis 2016 an der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg. Angeregt und betreut wurde sie durch Herrn Prof. Dr. P. Angele und Herrn PD Dr. M. Müller.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt

Vincent M. Reitz